

Université de Montréal

**Des chaperons pharmacologiques agissant sur les
récepteurs V2 de la vasopressine offrent un traitement
potentiel pour le diabète insipide néphrogénique**

par
Virginie Bernier

Département de Sciences Biomédicales
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de doctorat
en Sciences Biomédicales

Novembre 2004

© Virginie Bernier, 2004



AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Des chaperons pharmacologiques agissant sur les récepteurs V2 de la vasopressine offrent
un traitement potentiel pour le diabète insipide néphrogénique

présentée par :

Virginie Bernier

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Denis DeBlois, président-rapporteur

Daniel G. Bichet, directeur de recherche

Michel Bouvier, co-directeur

Luis A. Rokeach, membre du jury

Stéphane A. Laporte, examinateur externe

Sylvain Meloche, représentant du doyen de la FES

Résumé

Les maladies conformationnelles des protéines résultent souvent de mutations subtiles menant à la reconnaissance de la protéine affectée par le contrôle de qualité du reticulum endoplasmique (RE). Ces protéines reconnues comme étant mal repliées sont en interaction prolongée avec les chaperons moléculaires du RE avant d'être ubiquitinées et dégradées par le protéasome. Il existe plus de 170 mutations différentes dans le gène du récepteur V2 de la vasopressine responsables du diabète insipide néphrogénique (DIN), une maladie conformationnelle. Lorsqu'exprimé dans un système d'expression hétérologue, la plupart de ces récepteurs mutants ne sont pas exprimés à la surface cellulaire probablement du à un mauvais repliement de la protéine. De plus, ces récepteurs mutants sont exprimés seulement sous leur forme immature qui est rapidement dégradée. Dans le cadre de cette thèse, nous avons démontré que 4 antagonistes non-peptidique des récepteurs de la vasopressine (SR121463, VPA-985, SR49059 et YM087) peuvent agir comme chaperons pharmacologiques en rattrapant l'expression à la surface cellulaire et la fonction de récepteurs V2 mutants, tels L59P, del 61-64, L83Q, Y128S, R137H, W164S, S167L, A294P, P322H et R337X. Les traitements avec ces chaperons pharmacologiques facilitent la maturation de ces récepteurs mutants indiquée par l'accumulation de la forme complètement glycosylée du récepteur et son transport à la membrane plasmique. Ce sauvetage est accompagné par une réduction de l'ubiquitination du récepteur, tel que démontré pour la mutation W164S, indiquant qu'une plus petite proportion de récepteurs sont ciblés pour la dégradation. De plus, le traitement avec les chaperons pharmacologiques diminue le temps d'interaction entre les récepteurs mutants et un chaperon moléculaire, la calnexine, indiquant que le chaperon pharmacologique agit avant la calnexine en favorisant un meilleur processus de repliement. Cependant, le traitement avec le chaperon pharmacologique n'a aucun effet

sur l'interaction entre les récepteurs mutants et une autre protéine du RE, DRiP78, suggérant que le chaperon pharmacologique agit après DRiP78. En faveur de cette interprétation, alors que la maturation des récepteurs de type sauvage est augmentée, la surexpression de DRiP78 n'a aucun effet sur la maturation des récepteurs mutants. La récupération fonctionnelle des récepteurs résulte donc de l'action des chaperons pharmacologiques qui permettent de stabiliser une conformation native ou quasi-native de ces récepteurs mutants. De plus, nos résultats indiquent que les chaperons pharmacologiques agissent après DRiP78 mais avant le relâchement de la calnexine. Afin de tester le potentiel thérapeutique de l'action des chaperons pharmacologiques, les effets de l'administration du SR49059 ont été testés chez 5 patients portant les mutations del62-64, R137H ou W164S. L'administration de cet antagoniste chez les patients atteints de DIN a permis de réduire leur volume urinaire et d'augmenter leur osmolalité urinaire. Dans le cas de la mutation R137H, même si le phénotype de cette mutation était une désensibilisation constitutive des récepteurs, nous avons démontré que ces récepteurs mutants sont principalement retenus dans le RE et le chaperon pharmacologique peut partiellement rattrapper ces récepteurs mal repliés. Dans l'ensemble, la stratégie utilisée offre une preuve de concept qu'une thérapie avec les chaperons pharmacologiques peut être efficace dans le traitement du DIN ainsi que pour d'autres maladies conformationnelles. De plus, une meilleure compréhension des mécanismes d'action des chaperons pharmacologiques devrait faciliter le développement de nouveaux composés pour le traitement de maladies conformationnelles.

Mots-clés : diabète insipide néphrogénique, chaperon pharmacologique, récepteur V2 de la vasopressine, récepteur couplé aux protéines G, réticulum endoplasmique, arrestine, antagoniste non-peptidique de la vasopressine, DRiP78, calnexine, ubiquitination, maladie conformationnelle

Abstract

Conformational disease often results from modest mutations in proteins, which are then recognized by the endoplasmic reticulum (ER) quality control system as misfolded. These misfolded proteins interact for a longer period of time with ER molecular chaperones, are ubiquitinated and degraded by the proteasome. Over 170 mutations within the coding sequence of the V2 vasopressin receptor gene are known to cause nephrogenic diabetes insipidus (NDI), a conformational disease. When expressed in heterologous expression systems, most of these mutant receptors, including many missense mutations, are not expressed at the cell surface most likely as a result of improper folding. In this thesis, we reported that 4 cell permeable V2R antagonists (SR121463, VPA-985, SR49059 and YM087) can act as pharmacological chaperones to rescue the cell surface expression and the function of NDI V2R mutants (L59P, del 61-64, L83Q, Y128S, R137H, W164S, S167L, A294P, P322H, R337X). Metabolic labelling experiments carried out on these mutants showed that they were expressed as an immature, readily degraded form of the receptor. Treatment with the pharmacological chaperones facilitated the maturation of those mutant receptors as indicated by the accumulation of a long-lived fully glycosylated form of the receptor and its transport to the plasma membrane. This rescue was accompanied by a reduced ubiquitination, shown for the W164S mutant receptor, indicating that a smaller proportion was targeted to the proteasome. Pulse chase experiments also revealed that the pharmacological chaperones treatment decreased the interaction time between mutant receptors and the ER molecular chaperone, calnexin, indicative of a better folding process. However, the treatment with the pharmacological chaperone had no effect on the interaction of the mutant receptors with the ER-resident protein, DRiP78, suggesting that the pharmacological chaperones had its action downstream of DRiP78. Consistent with this

interpretation, while increasing the maturation of wild type receptor, overexpression of DRiP78 had no effect on the maturation of misfolded mutant receptors. The functional rescue of receptor therefore results from a pharmacological chaperone action that promotes the proper folding of the mutant receptor. Moreover, our data indicate that the pharmacological chaperones could have their actions downstream of DRiP78 but before or concomitantly with calnexin. To test the potential therapeutic action of pharmacological chaperones, the effects of one antagonist SR49049 were assessed in 5 patients harbouring the del62-64, R137H or W164S mutations. Administration of this antagonist to NDI-patients improves urine concentration and reduces urinary output. In the case of the mutation R137H, even if the phenotype of these mutant receptors was shown to be a constitutive desensitisation, we have demonstrated that these mutant receptors are mostly misfolded leading to their retention in the ER and the pharmacological chaperone can partially rescue those improperly folded receptors. Overall, the strategy used offers a proof-of-concept that pharmacological chaperone-mediated therapy could be effective in the treatment of diseases resulting from protein misfolding and a better understanding of the mechanisms involved should facilitate the development of new therapeutic compounds.

Keywords : nephrogenic diabetes insipidus, pharmacological chaperone, V2 vasopressin receptor, G protein-coupled receptor, endoplasmic reticulum, arrestin, non-peptidic vasopressin antagonist, DRiP78, calnexin, ubiquitination, conformational disease

Table des matières

Résumé	iii
Liste des tableaux	xi
Liste des figures	xii
Liste des sigles et abbréviations	xiv
Remerciements	xvii
Préambule	xviii
Maladies conformationnelles et systèmes de contrôle de qualité	1
1.1 Contrôle de qualité du réticulum endoplasmique	2
1.1.1 Le complexe BiP	10
1.1.2 Le complexe calnexine/calréticuline	14
1.1.3 Ciblage pour la dégradation	16
1.1.4 Chaperons spécifiques	19
1.1.5 Agrégation	21

1.1.6 Export des protéines du réticulum endoplasmique	23
1.2 Contrôle de qualité du cytosol	25
1.3 Contrôle de qualité du Golgi	25
Diabète insipide néphrogénique et physiologie rénale	27
2.1 Anatomie et physiologie rénale	28
2.1.1 Tubule contourné proximal	31
2.1.2 Anse descendante du néphron	31
2.1.3 Anse ascendante du néphron	32
2.1.4 Tubule contourné distal	33
2.1.5 Tubule rénal collecteur	33
2.1.5.1 La vasopressine	35
2.1.5.2 Le récepteur V2 de la vasopressine	37
2.1.5.3 L'aquaporine-2	39
2.2 Diabète insipide néphrogénique congénital	41
2.2.1 Mutations du récepteur V2 de la vasopressine	43
2.2.1 Mutations de l'aquaporine-2	46
Récepteurs couplés aux protéines G	48
3.1 Topologie	50
3.2 Activation	55

3.2.1 MAPK	60
3.2.1.1 Effecteurs classiques des protéines G	62
3.2.1.2 β -arrestine	63
3.2.1.3 Transactivation par les récepteurs tyrosine kinase	64
3.3 Désensibilisation	66
3.3.1 Kinases activées par des seconds messagers	66
3.3.2 GRK	67
3.3.3 Arrestine	68
3.4 Internalisation	73
Chaperons pharmacologiques	76
4.1 Pharmacological chaperones : potential treatment for conformational diseases	78
4.2 Pharmacological chaperone action on G-protein-coupled receptors	86
Objectifs	93
Résultats	95
6.1 Premier article	96
Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptors mutants	96
6.2 Deuxième article	108
Probing the ER site of action of the pharmacological chaperone SR121463 reveals a role for DRiP78 upstream of calnexin in the folding of the V2 vasopressin receptor	108

6.3 Troisième article	163
Pharmacological chaperones as a potentiel treatment for X-linked nephrogenic diabetes insipidus	163
6.4 Quatrième article	194
Functional rescue of the constitutively internalized V2 vasopressin receptor mutant R137H by the pharmacological chaperone action of SR49059	194
Discussion	208
Références	232
Annexe	285

Liste des tableaux

Tableau 1 : Exemples de maladies conformationnelles (dégradation)	5
Tableau 2 : Exemples de maladies conformationnelles (agrégation)	6
Tableau 3 : Effet de l'administration du SR49059 chez des patients atteints de diabète insipide néphrogénique	225
Tableau 4 : Effet de différents chaperons pharmacologiques (SR121463, VPA-985, SR49059 et YM087) sur l'expression à la surface cellulaire et l'accumulation d'AMPc de récepteurs V2 de la vasopressine mutants.	231

Liste des figures

Figure 1 : Contrôle de qualité des protéines sécrétées et membranaires	3
Figure 2 : Translocation des protéines à travers la membrane du réticulum endoplasmique	8
Figure 3 : N-Glycosylation d'une protéine	9
Figure 4 : Formation et isomérisation des ponts disulfures catalysées par la PDI	13
Figure 5 : Processus d'ubiquitination	18
Figure 6 : Formation de vésicules COPII	24
Figure 7 : Schématisation d'un néphron et concentration de l'urine.	29
Figure 8 : Système de contre-courant	32
Figure 9 : Représentation schématique d'une cellule du tubule rénal collecteur.	35
Figure 10 : Structure tridimensionnelle de la vasopressine.	36
Figure 11 : Représentation schématique du récepteur V2 de la vasopressine humain.	38
Figure 12 : Arrangement de l'aquaporine-2 dans la membrane	39
Figure 13 : Représentation schématique du récepteur V2 de la vasopressine	44
Figure 14 : Représentation schématique d'un récepteur couplé aux protéines G	50
Figure 15 : Structure tridimensionnelle de la rhodopsine	52
Figure 16 : Familles de récepteurs couplés aux protéines G	54
Figure 17 : Rôle de la dimérisation dans la vie d'un récepteur couplé aux protéines G	55
Figure 18 : Différents états d'activation en fonction du type de ligand	56

Figure 19 : Structure tridimensionnelle de la protéine G sous la rhodopsine	57
Figure 20 : Diversité des voies d'activation des protéines G	58
Figure 21 : Voies de signalisation suite à l'activation des protéines $G\alpha_s$, $G\alpha_i$ ou $G\alpha_q$	60
Figure 22 : Activation des MAPK par les récepteurs couplés aux protéines G	61
Figure 23 : Activation des MAPK directement par un récepteur couplé aux protéines G	62
Figure 24 : Activation des MAPK par la β -arrestine	63
Figure 25 : Activation des MAPK par les récepteurs couplés aux protéines G	64
Figure 26 : Activation des MAPK par les récepteurs couplés aux protéines G	65
Figure 27 : Activation de l'arrestine provoquant l'ouverture des domaines N et C	68
Figure 28 : Internalisation des récepteurs de la classe A versus la classe B	71
Figure 29 : Hypothèse du mécanisme d'action des chaperons pharmacologiques	222

Liste des sigles et abréviations

AAA ATPase : ATPases associated with multiple cellular activities

ACTH : adrenocorticotrophic hormone

AP-2 : adaptor protein-2

BiP : binding protein

CFTR : cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

CGRP : calcitonin gene-related peptide

CHIP28 : channel-forming integral membrane protein

COP : coat protein complex

CRE : cAMP response element

CRLR : calcitonin receptor like receptor

DAG : diacylglycérol

DIN : diabète insipide néphrogénique

DRiP78 : Dopamine receptor interacting protein

EDEM : endoplasmic reticulum-degradation enhancing 1,2-mannosidase-like protein

EGF : epidermal growth factor

ERAD : endoplasmic reticulum-associated degradation

ERGIC : endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment

ERK : extracellular signal-regulated kinase

ERp : endoplasmic reticulum protein

G-CK : Golgi apparatus casein kinase

GNRH : gonadotropin-releasing hormone

GPI : glycoposphatidylinositol

GRK : G protein-coupled receptor kinase

GRP : glucose-related protein

HB-EGF : heparine binding EGF

HSP : heat shock protein

IP3 : inositol 1,4,5-trisphosphate

LDLR : low density lipoprotein-receptor

LPA : lysophosphatidic acid

MAPK : mitogen-activated protein kinase

Mdm2 : murine double minute clone 2

PDGF : platelet-derived growth factor

PDI : protein disulfide isomerase

PIP2 : phosphoinositol 4,5-bisphosphate

PKA : protéine kinase A

PKC : protéine kinase C

PLA : phospholipase A

PLC : phospholipase C

RAMP : receptor activity modifying protein

RAP : receptor-associated protein

RE : réticulum endoplasmique

SNARE : soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor

SRP : signal recognition particle

TSH : thyroid stimulating hormone

VIP : vasointestinal peptide

Aux deux personnes les plus importantes dans ma vie...

ma mère Ginette

mon amour Simon

Remerciements

Je remercie tout d'abord mes directeurs de recherche, les Dr Daniel Bichet et Michel Bouvier, pour leur confiance à mon égard et la chance d'avoir travaillé dans leur excellent laboratoire. C'est par leur soutien et encouragements que j'ai acquis une plus grande confiance en moi. Ils m'ont inspiré persévérance et intégrité.

Je remercie mon conjoint Simon pour tout son amour, son support et sa grande compréhension depuis le début de cette belle aventure. Je remercie ma mère Ginette de m'avoir transmis de bonnes valeurs et l'importance de l'éducation.

Je remercie tous les membres du laboratoire de Michel Bouvier car ils ont tous de près ou de loin contribué à leur façon à ma progression, plus particulièrement, Jean-Pierre Morello qui fut mon mentor et dont je suis très reconnaissante, Monique Lagacé pour sa présence constante ainsi que ses judicieux conseils autant sur le plan scientifique que personnel, et finalement, Ali Salahpour, Pascale Charest et Stéphanie Pontier pour leur grand support et les nombreuses discussions scientifiques.

Je remercie aussi tous les membres du laboratoire de Daniel Bichet à l'hôpital Sacré-Coeur qui malgré la distance m'ont aussi apporté beaucoup, plus particulièrement Michèle, Marie-Françoise et Danielle.

Je remercie aussi tous les membres de ma famille et amis pour leur support, plus particulièrement Constance pour son grand support moral et grammatical.

Préambule

L'objectif de cette thèse est de tester l'hypothèse que les chaperons pharmacologiques peuvent réchapper l'expression à la surface cellulaire et la fonction de récepteurs V2 de la vasopressine mutants et offrir un traitement potentiel pour le diabète insipide néphrogénique.

Dans l'introduction, le système de contrôle de qualité du réticulum endoplasmique sera tout d'abord traité puisque la majorité des récepteurs mutants responsables du diabète insipide néphrogénique sont retenus dans le réticulum endoplasmique suite à la reconnaissance du mauvais repliement de la protéine par ce système. Par la suite, comme la maladie conformationnelle faisant l'objet de cette thèse est le diabète insipide néphrogénique, cette pathologie ainsi que la physiologie rénale seront discutées. Ensuite, les récepteurs couplés aux protéines G seront vus puisque le récepteur V2 de la vasopressine fait partie de cette grande famille de récepteurs. Finalement, deux revues de la littérature traitant de la récente découverte des chaperons pharmacologiques termineront cette introduction.

Dans les résultats, 4 articles scientifiques seront présentés. Le premier article discute de la récupération fonctionnelle de récepteurs V2 mutants à l'aide de chaperons pharmacologiques dans un système cellulaire. Le deuxième article propose un mécanisme d'action des chaperons pharmacologiques dans le sauvetage de ces récepteurs mutants. Le troisième article démontre le traitement potentiel du diabète insipide néphrogénique chez 5 patients à l'aide d'un chaperon pharmacologique. Finalement, le quatrième article traite de la récupération fonctionnelle de récepteurs V2 de la vasopressine portant la mutation R137H à

l'aide de chaperons pharmacologiques. Il a été suggéré que le phénotype de cette mutation soit une désensibilisation constitutive et comme des patients portant cette mutation répondent bien au traitement avec les chaperons pharmacologiques, nous avons exploré le mécanisme d'action des chaperons pharmacologiques pour cette mutation particulière.

Chapitre 1

Maladies conformationnelles et systèmes de contrôle de qualité

Les maladies conformationnelles sont causées par un changement de conformation d'une protéine, résultant de diverses mutations, majoritairement de simples mutations faux-sens, qui affectent la structure tridimensionnelle des protéines (tableaux 1 et 2). Plusieurs systèmes de contrôle de qualité existent afin de protéger l'organisme contre des activités cellulaires aberrantes. Ces systèmes, très rigoureux grâce à la participation d'une multitude de protéines accessoires, tels les chaperons moléculaires, permettent d'assurer que seules les protéines complètement et correctement repliées peuvent atteindre leur site d'action. Étant donné que la protéine faisant l'objet de cette thèse, soit le récepteur V2 de la vasopressine, se replie dans le réticulum endoplasmique, seulement ce système de contrôle de qualité sera vu en détails (Figure 1).

1.1 Contrôle de qualité du réticulum endoplasmique

Plusieurs éléments du réticulum endoplasmique contribuent au bon repliement et à la maturation des protéines, tels les ions, les conditions redox, la concentration de calcium et la composition en chaperons moléculaires (Berridge, 2002; Ellgaard and Helenius, 2003; Papp et al., 2003). De plus, ces éléments sont souvent dépendants les uns des autres. Par exemple, plusieurs chaperons moléculaires, tels les chaperons BiP (Binding Protein), GRP94 (glucose-related protein) et calnexine/calréticuline, lient le calcium et une diminution du taux de calcium peut affecter leur fonction (Papp et al., 2003). Ensuite, plusieurs modifications co- et post-traductionnelles prennent place, telles la formation de ponts disulfures, la coupure de signaux par des peptidases, la glycosylation et l'addition d'un GPI (glycophosphatidylinositol).

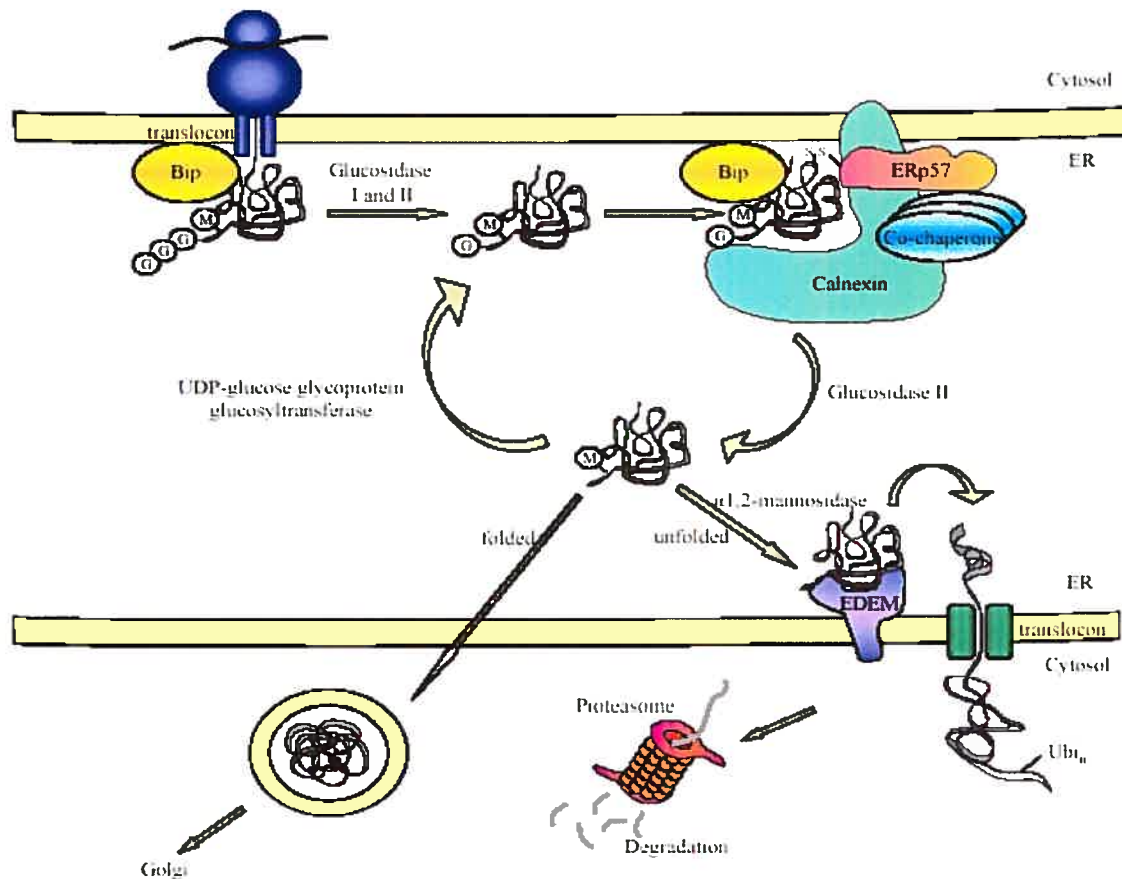


Figure 1 : Contrôle de qualité des protéines sécrétées et membranaires

Comme la protéine est synthétisée, transloquée dans le réticulum endoplasmique et glycosylée, des chaperons moléculaires, tel BiP, vont aider au bon repliement. Puis, la protéine sera partiellement déglucosylée par les glucosidases I et II et la forme monoglucosylée sera reconnue par la lectine calnexine, un autre chaperon moléculaire aidant le repliement. Ensuite, la protéine va être complètement déglucosylée par la glucosidase II et reglucosylée par l'UDP-glucose-glycoprotein glucosyltransferase. Il y aura plusieurs cycles de liaisons et dissociations avec la calnexine jusqu'à ce que la protéine soit bien repliée pour être exportée du réticulum endoplasmique. Si la protéine ne peut atteindre la bonne conformation, un mannose sera clivé par la α 1,2-mannosidase et la protéine sera rétrotransloquée dans le cytosol, ubiquitinée et dégradée par le protéasome.

Les protéines sont retenues dans le réticulum endoplasmique tant qu'elles ne sont pas bien repliées grâce à deux mécanismes. Le premier est leur interaction prolongée avec les chaperons moléculaires du système de contrôle de qualité du réticulum endoplasmique suivi de leur dégradation prématuré par le protéasome (tableau 1). Le deuxième mécanisme implique la formation de gros agrégats associés aux chaperons moléculaires, souvent due à l'hydrophobicité de la protéine. Ces agrégats ne peuvent alors échapper le réticulum endoplasmique et deviennent toxiques pour la cellule (tableau 2)

Lors de la biosynthèse, les protéines sont transloquées dans le réticulum endoplasmique et le repliement se déroule en trois étapes. La première étape est lors de la translocation à travers le translocon, la deuxième étape est une fois la synthèse terminée et finalement, la troisième étape est lors de l'assemblage oligomérique (Ellgaard and Helenius, 2003). Comme le réticulum endoplasmique est un compartiment hétérogène, il semble y avoir certaines régions plus spécialisées pour certaines de ces étapes (Berridge, 2002; Papp et al., 2003; Roth et al., 2002; Sullivan et al., 2003). Par exemple, certaines protéines mal repliées semblent s'accumuler dans un compartiment du réticulum endoplasmique, nommé corps de Russell, avant d'être ciblées pour la dégradation (Sullivan et al., 2003).

Les chaperons moléculaires interagissent spécifiquement avec les protéines mal repliées grâce aux propriétés biophysiques des protéines, tels les zones hydrophobes, les boucles mobiles, les cystéines libres, l'absence de compacité et la glycosylation. Ils exercent deux rôles, soit assister le repliement et expédier les protéines qui n'atteignent pas la bonne conformation pour la dégradation, processus connu sous le nom de ERAD (endoplasmic reticulum-associated degradation) (Ellgaard and Helenius, 2003). Le contrôle de qualité inclut

Tableau 1 : Exemples de maladies conformationnelles (dégradation)

Maladie	Incidence	Protéine impliquée	Site d'action
Albinisme	1/15 000	Tyrosinase	Melanosome
Cancer	50-55% des cancers humains	Smoothed p53	Surface cellulaire
		pp60	Cytosol
		Enzyme Ubiquitin-activating E1	Cytosol
		Récepteur glucocorticoïde	Noyau
		Récepteur V2 de la vasopressine	Surface cellulaire
Diabète insipide néphogénique	1/250 000	$\alpha 1$ -antitrypsine	Protéine sécrétée
Emphysème	1/500	CFTR	Surface cellulaire
Fibrose kystique	1/2500	Récepteur-1 sulfonyleurea	Surface cellulaire
Hypoglycémie hyperinsulémique	1/50 000	Récepteur gonadotropin-releasing hormone	Surface cellulaire
Hypogonadisme hypogonadotrope	F : 1/10 000 ; H : 1/1000	α -Galactosidase A	Lysosome
Maladie de Fabry	1/400 000	Menke	Surface cellulaire
Maladie de Menkes	1/50 000		

Tableau 2 : Exemples de maladies conformationnelles (agrégation)

Maladie	Incidence	Protéine impliquée	Site d'action
β -Galactosidose	1/100-320 000	β -galactosidase	Lysosome
Maladie de gaucher	1/100 000	β -Glucosidase	Lysosome
Prion	1/1 000 000	Prion	Cytosol
Retinitis pigmentosa	1/3500	Rhodopsine	Surface cellulaire
Syndrome Long QT	1/7000	HERG K + channel	Surface cellulaire
Transthyrétin amyloïdose	Inconnue	Transthyrétin	Cytosol

aussi des enzymes qui vont sélectivement et de manière covalente marquer les protéines mal repliées pour leur reconnaissance par la machinerie de dégradation. Les deux plus connues sont l'ubiquitine, une petite protéine qui s'attache aux lysines de la protéine en tant que signal pour la dégradation, et le glucose, qui est ajouté au N-glycan des glycoprotéines en tant que signal de rétention du réticulum endoplasmique.

Lors de la synthèse des protéines sécrétées et membranaires, les ribosomes vont s'associer à la membrane du réticulum endoplasmique afin de permettre au polypeptide d'être transloqué dans la lumière ou dans la membrane du réticulum endoplasmique (Figure 2) (Johnson and van Waes, 1999). Cette association est possible, dans la majorité des cas, grâce à un peptide signal à l'extrémité de la protéine qui est reconnu par la protéine SRP (Signal Recognition Particle) qui elle va lier son récepteur à la membrane du réticulum endoplasmique (Rapiejko and Gilmore, 1997). Ensuite, la protéine passe par le translocon sec61 pour atteindre la lumière du réticulum endoplasmique et le peptide signal peut être coupé. Dans le cas d'un récepteur à sept passages transmembranaires, comme le récepteur V2 de la vasopressine, le peptide signal va être clivé et la translocation est arrêtée par un signal d'arrêt, qui va devenir le premier passage transmembranaire, et ainsi de suite jusqu'à ce que les sept passages transmembranaires soient incorporés dans la membrane. Le translocon sec61, qui permet un passage bidirectionnel, est un complexe hétérotrimérique composé d'une sous-unité alpha, qui forme le pore avec ses dix passages transmembranaires, d'une sous-unités beta, qui permet l'association de la peptidase au polypeptide afin de cliver le peptide signal, et finalement d'une sous-unité gamma, qui stabilise le complexe (Johnson and van Waes, 1999; Romisch, 1999).

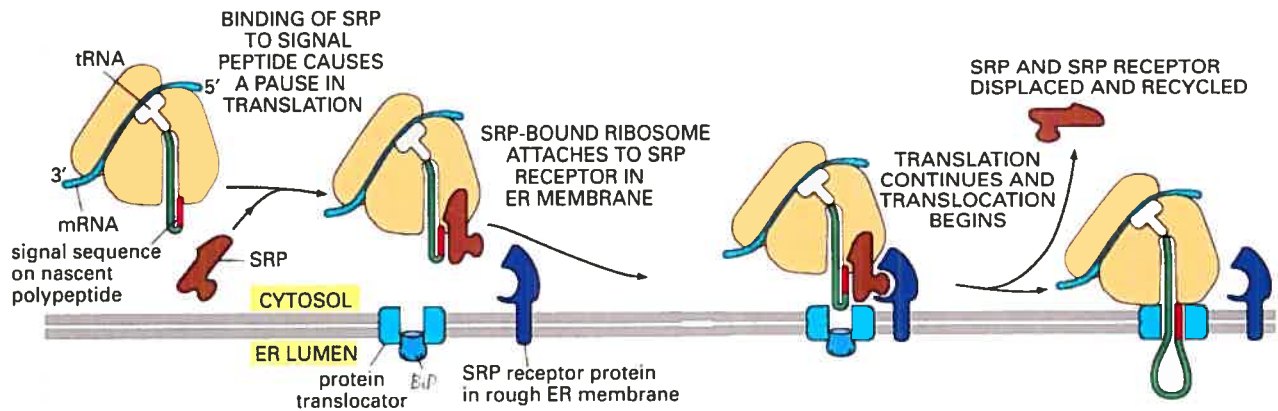


Figure 2 : Translocation des protéines à travers la membrane du réticulum endoplasmique

Lors de la synthèse de la protéine, un peptide signal à l'extrémité de la protéine va lier le SRP. Ensuite, le SRP va lier son récepteur à la surface de la membrane du réticulum endoplasmique, près du translocon, et va amener le ribosome au translocon. Puis la protéine va être transloquée dans la membrane du réticulum endoplasmique (Johnson and van Waes, 1999).

La protéine BiP interagit directement avec le translocon et joue alors un premier rôle en bloquant l'ouverture du translocon en l'absence du polypeptide afin d'éviter le passage de molécules non désirées, par exemple, des ions (Hamman et al., 1998). Conséquemment, lorsqu'il y a accumulation de protéines mal repliées dans le réticulum endoplasmique entraînant une séquestration de la protéine BiP, il y a des fuites de calcium (Lomax et al., 2002).

Toujours lors de la biosynthèse, les glycoprotéines sont glycosylées par l'ajout d'un N-glycan sur une asparagine (Figure 3) (Kornfeld and Kornfeld, 1985). Ce N-glycan, comprenant 3 glucose, 9 mannose et 2 N-acetylglucosamine, est synthétisé sur un dolichol avant d'être transféré sur l'asparagine du polypeptide grâce à l'oligosaccharyltransferase (Helenius and Aebi, 2001).

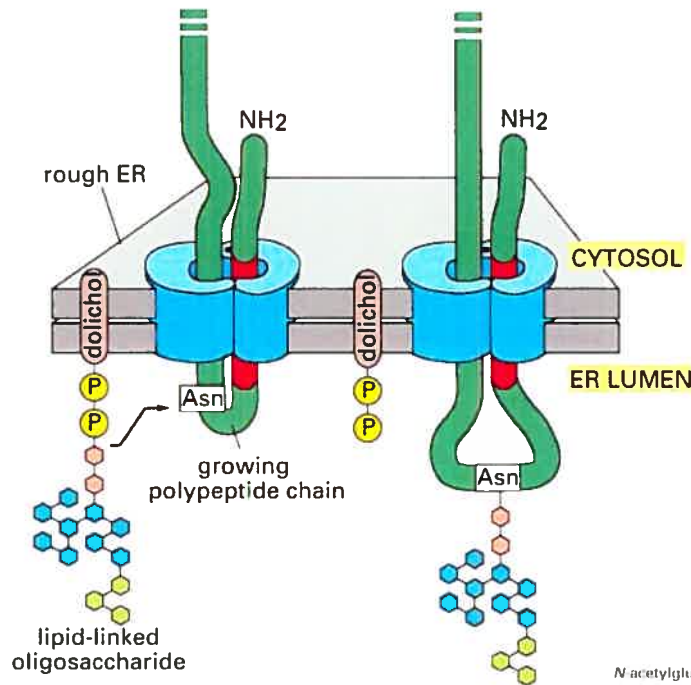


Figure 3 : N-Glycosylation d'une protéine

Le N-glycan, composé de 3 glucose, 9 mannose et 2 N-acetylglucosamine, est transféré du dolichol à une asparagine de la protéine (Kornfeld and Kornfeld, 1985).

Une fois la protéine dans le réticulum endoplasmique ou insérée dans la membrane, il semble exister deux complexes de chaperons moléculaires exécutant des fonctions différentes afin de permettre à la protéine d'atteindre la bonne conformation, soit le complexe de BiP et le complexe calnexine/calréticuline. Quelques études démontrent une séparation spatio-temporelle des deux complexes de chaperons puisqu'aucune composante du complexe calnexine/calréticuline n'a été détectée avec le complexe BiP (Meunier et al., 2002). De plus, les protéines mal repliées s'accumulent dans un compartiment contenant la calnexine et la calréticuline mais pas BiP, PDI (protein disulfide isomerase) ou UDP-glucosyltransferase supportant une fois de plus la séparation spatiale de ces deux complexes (Kamhi-Nesher et al., 2001).

Dans certains cas, les protéines utilisent l'un des deux systèmes (Molinari and Helenius, 2000) alors que dans d'autres cas, elles empruntent les deux systèmes successivement (Hammond and Helenius, 1994). Il semble que la position du N-glycan détermine le choix du complexe de chaperons, c'est-à-dire que si le N-glycan se lie à la chaîne peptidique dans les 50 premiers acides aminés, le complexe de calnexine/calréticuline va lier. Alors que si le N-glycan se lie après le 50^e acide aminé, le complexe de BiP va se lier puis, lors des modifications post-traductionnelles, le complexe calnexine/calréticuline prendra la relève (Molinari and Helenius, 2000). Cependant, il arrive que pour une même protéine, la forme sauvage et différents mutants ne lient pas les mêmes chaperons (Mizrachi and Segaloff, 2004). De plus, dans le cas d'une protéine glycosylée, la calnexine/calréticuline aurait un net avantage sur BiP pour éviter l'agrégation (Stronge et al., 2001). Effectivement, certaines études suggèrent une double liaison du complexe calnexine/calréticuline à la protéine en voie de repliement grâce à un autre site dans le domaine globulaire. Cette deuxième liaison permettrait au complexe calnexine/calréticuline d'interagir autant avec les protéines glycosylées que non glycosylées (Danilczyk and Williams, 2001; Saito et al., 1999; Stronge et al., 2001). Réciproquement, certains substrats du complexe calnexine/calréticuline peuvent lier BiP lorsque leur glycosylation est bloquée (Balow et al., 1995; Zhang et al., 1997).

1.1.1 Le complexe BiP

La protéine BiP, aussi connue sous le nom de GRP78 (glucose related protein), est un chaperon moléculaire de la famille des HSP70 (heat shock protein) très abondant dans la

lumière du réticulum endoplasmique et essentiel à la survie (Gething, 1999). BiP lie de façon transitoire les protéines nouvellement synthétisées et de façon plus permanentes les protéines mal repliées afin d'éviter leur agrégation inter- et intra-moléculaire ainsi que leur export du réticulum endoplasmique (Gething and Sambrook, 1992;Hartl, 1996;Hendershot et al., 1996;Simons et al., 1995).

BiP, comme les protéines de la famille des HSP70, est composé de deux domaines, soit un domaine à l'extrémité amine contenant une activité ATPase et un domaine à l'extrémité carboxyle contenant le site de liaison au substrat (McKay, 1993). L'affinité du domaine carboxyle pour le substrat dépend de l'occupation par l'ATP (basse affinité mais liaison rapide) ou l'ADP (haute affinité mais liaison lente) du domaine amine alors que l'occupation du domaine carboxyle par le substrat favorise l'hydrolyse de l'ATP (Blond-Elguindi et al., 1993a;Blond-Elguindi et al., 1993b;Flynn et al., 1989;Fourie et al., 1994;Knarr et al., 1995). En fait, la liaison de l'ATP permet l'ouverture des deux domaines alors que l'hydrolyse de l'ATP entraîne la fermeture des deux domaines qui va emprisonner le substrat. De plus, la protéine DnaJ agit en tant que co-chaperon en permettant la régulation de l'activité ATPase de BiP (Buchner, 1999).

Le premier complexe de chaperons moléculaires incluant BiP et plusieurs autres chaperons moléculaires permet d'assister le repliement des protéines parallèlement à la synthèse dès leur sortie du translocon en tirant le polypeptide dans la lumière du réticulum endoplasmique tout en cachant les zones hydrophobes afin d'éviter leur agrégation (Blond-Elguindi et al., 1993a;Brodsky, 1996;Flynn et al., 1991;Gething, 1999;Lyman and Schekman, 1997). Comme BiP interagit avec une multitude de substrats, il semble que la seule règle de

reconnaissance d'un substrat par BiP soit simplement l'hydrophobicité du polypeptide (Blond-Elguindi et al., 1993a; Flynn et al., 1991). La structure tridimensionnelle de DnaK, l'homologue bactérien de BiP (Rudiger et al., 1997), a révélé que le site de liaison permet la reconnaissance de petites séquences de 7-8 acides aminés aromatiques/hydrophobes, qui dans le cas des protéines bien repliées sont normalement cachées à l'intérieur de la protéine (Zhu et al., 1996). Comme ce type de séquence existe à plusieurs endroits dans la protéine, il est très probable que plusieurs protéines BiP puissent lier le substrat en même temps afin de cacher divers endroits.

Plusieurs autres chaperons moléculaires vont assister le repliement avec la protéine BiP. Il a même été démontré qu'il existe un grand complexe constitutif de protéines pré-associées avec BiP même en l'absence de protéines mal repliées, comprenant les protéines GRP94; CaBP1; PDI; cyclophilin B; ERp72; GRP170; UDP-glucosyltransferase et SDF2-L1 (Meunier et al., 2002). Certains chaperons vont aussi lier ce complexe spécifiquement en fonction de la protéine mal repliée.

La fonction exacte de GRP94, membre de la famille des HSP90, n'est pas connue, cependant, il semble que GRP94 lie les protéines un peu plus tard que BiP lors du repliement, ce qui pourrait indiquer que ces deux protéines agiraient en tandem dans le repliement (Melnick et al., 1994).

La protéine PDI quant à elle agit en synergie avec BiP afin de favoriser le bon repliement des protéines en permettant la formation de ponts disulfures (Gonz et al., 2002; Mayer et al., 2000; Shusta et al., 1998). Cette protéine abondante du réticulum endoplasmique fait partie de la famille des thiol-disulphide oxidoréductases et permet autant

la formation du pont disulfure par son activité oxydase que le réarrangement des mauvais ponts par son activité isomérase (Figure 4) (Wilkinson and Gilbert, 2004). Ces fonctions sont possibles grâce au milieu oxydatif du réticulum endoplasmique qui est maintenu en présence de glutathione.

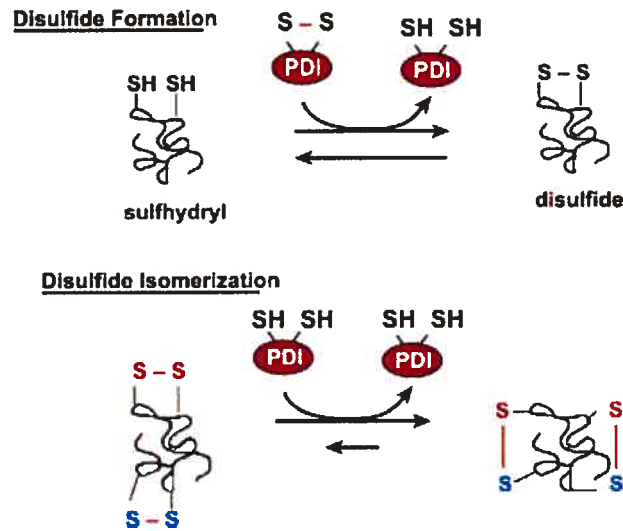


Figure 4 : Formation et isomérisation des ponts disulfures catalysées par la PDI

La formation des ponts disulfures se produit lorsque les équivalents oxydants sont transférés de la forme oxydée de la PDI à la forme réduite de la protéine. L'isomérisation, quant à elle, requiert la forme réduite de la PDI (Wilkinson and Gilbert, 2004).

La formation des ponts disulfures se produit très tôt lors de la biosynthèse, ce qui entraîne souvent des erreurs (Wilkinson and Gilbert, 2004). La correction de ces erreurs est réalisée grâce à l'activité isomérase de la PDI (Wilkinson and Gilbert, 2004). De plus, les protéines bien repliées ne sont pas de bons substrats pour la protéine PDI, en fait, les protéines en voie de repliement sont 100 fois plus affines pour PDI (Wilkinson and Gilbert, 2004).

1.1.2 Le complexe calnexine/calréticuline

Le deuxième complexe incluant la calnexine, la calréticuline et plusieurs autres chaperons moléculaires agit un peu plus tard (Hammond and Helenius, 1994) en reconnaissant principalement l'état de glycosylation des protéines (Hammond et al., 1994). Lors du repliement, il y a plusieurs cycles de liaisons et de relâchements avec le complexe calnexine/calréticuline permettant la rétention de la protéine dans le réticulum endoplasmique tant que celle-ci n'est pas bien repliée. Plus la protéine reste longtemps dans le réticulum endoplasmique, plus elle a de chance d'atteindre la bonne conformation.

La calnexine est une protéine transmembranaire alors que la calréticuline est une protéine luménale du réticulum endoplasmique. Leur site de liaison au glycan se trouve dans le domaine lectine globulaire (Schrag et al., 2001). Ces deux protéines homologues semblent lier des substrats différents. Des études ont démontré que lorsque le domaine transmembranaire de la calnexine est transféré à la calréticuline, la calréticuline liera les substrats de la calnexine. De même, lorsque le domaine transmembranaire de la calnexine est enlevé, la calnexine va lier les substrats de la calréticuline. Ces résultats indiquent que leur topologie permet une certaine spécificité (Danilczyk et al., 2000; Wada et al., 1995).

À l'image de BiP, le complexe calnexine/calréticuline possède un co-chaperon de la famille des thiol/disulfide oxidoreductases, ERp57 (endoplasmic reticulum protein), qui permet d'accélérer la formation des ponts disulfures des protéines N-glycosylées (Oliver et al., 1997; Oliver et al., 1999). Toutefois, ERp57 n'interagit pas directement avec la protéine mal repliée (Mizrachi and Segaloff, 2004) et semble former un complexe 1:1 avec les

chaperons calnexine et calréticuline grâce à des ponts disulfures (Leach et al., 2002; Oliver et al., 1999; Pollock et al., 2004).

Trois enzymes fonctionnellement indépendantes du réticulum endoplasmique permettent le cycle de liaison entre la protéine en voie de repliement et le complexe calnexine/calréticuline, soit la glucosidase I et II et l'UDP-glucose : glycoprotein glucosyltransferase (Ellgaard et al., 1999; Ellgaard and Helenius, 2003; Zapun et al., 1999). Tout d'abord, la glucosidase I permet d'enlever un premier glucose sur le N-glycan suivi d'un deuxième glucose grâce à la glucosidase II. Alors le substrat, qui est monoglucosylé, peut lier le complexe calnexine/calréticuline. Puis, la glucosidase II va enlever le dernier glucose afin de dissocier la protéine du complexe calnexine/calréticuline (Zapun et al., 1997). À ce moment, la protéine peut être reglucosylée par l'UDP-glucose : glycoprotein glucosyltransferase afin de permettre à la protéine de lier à nouveau ou non le complexe calnexine/calréticuline (Hammond et al., 1994; Parodi, 1999; Sousa et al., 1992). Il y a donc plusieurs cycles de liaison et dissociation avec ce complexe jusqu'à ce que la protéine soit bien repliée. Lorsque la protéine est bien repliée, elle ne sera pas reglucosylée par l'UDP-glucose : glycoprotein glucosyltransferase mais plutôt exportée du réticulum endoplasmique vers le Golgi. Alors, l'UDP-glucose : glycoprotein glucosyltransferase agit comme un détecteur du repliement, reconnaissant les zones hydrophobes du côté carboxyle du site de glucosylation (Caramelo et al., 2003; Sousa and Parodi, 1995), et le glucose est l'empreinte d'une protéine mal repliée. L'UDP-glucose : glycoprotein glucosyltransferase est très fidèle puisque des études ont démontré qu'elle ne reconnaît pas les protéines bien repliées, les petits glycopeptides ou les N-glycans libres mais seulement des défauts très précis (Parodi, 2000; Trombetta and Helenius, 2000).

1.1.3 Ciblage pour la dégradation

Lorsque la protéine n'arrive pas à bien se replier, un mannose dans la branche du centre sera enlevé grâce à la ER α 1,2-mannosidase II (Lal et al., 1998). Il semble que la ER α 1,2-mannosidase II soit le chronomètre qui détermine le temps que la protéine a pour se replier (Ellgaard and Helenius, 2001; Helenius et al., 1997; Jakob et al., 1998; Sifers, 2003). En fait, la ER α 1,2-mannosidase aurait besoin d'une plus longue période de temps pour hydrolyser un mannose, laissant le temps au cycle calnexine/calréticuline d'aider le repliement de la protéine. Lorsque le mannose de la protéine est enlevé, la protéine sera reconnu par la lectine EDEM (endoplasmic reticulum-Degradation-Enhancing 1,2-Mannosidase-like protein), ce qui entraînera son ciblage au translocon sec61 et empêcher sa reglucosylation par l'UDP-glucose : glycoprotein glucosyltransferase (Hosokawa et al., 2001; Jakob et al., 2001).

Généralement, les protéines sont déglucosylées par une peptide:N-glycanase et dépliées dans la lumière du réticulum endoplasmique afin de leur permettre de passer dans le translocon pour atteindre le cytosol, phénomène appelé rétrotranslocation. Cependant, dans certains cas, il fut démontré que des protéines bien repliées peuvent tout de même traverser le translocon (Tirosh et al., 2003).

Dès la sortie de la protéine du translocon, elle sera polyubiquitinée. L'ubiquitination est l'ajout covalent d'ubiquitines, une protéine de 76 acides aminés, par un lien isopeptide sur

une lysine de la protéine à être dégradée (Hershko and Ciechanover, 1998; Hochstrasser, 1996). La polyubiquitination est l'ajout d'une ubiquitine sur la lysine 48 de l'ubiquitine lié au substrat et ainsi de suite, un minimum de 4 ubiquitines doivent être liées afin de cibler pour la dégradation par le protéasome (Hershko and Ciechanover, 1998; Hochstrasser, 1996). Cependant, la lysine 63 peut, elle aussi, être polyubiquitination et dans ce cas, l'ubiquitination provoque un signal différent, par exemple, la réparation de l'ADN ou l'activation de la kinase I κ B α (Pickart, 2001b). La monoubiquitination, quant à elle, semble jouer un rôle différent (Hicke, 2001b), par exemple, dans l'endocytose et le triage au niveau des endosomes vers le recyclage ou la dégradation par le lysosome (Hicke, 2001a; Katzmann et al., 2001), ainsi que le transport au noyau et l'expression des gènes (Pickart, 2001b). L'ajout d'ubiquitine sur une protéine se fait grâce à trois enzymes (Figure 5) (Pickart, 2001a). La E1 ubiquitin-activating enzyme forme un lien thiol ester avec la glycine 76 de l'ubiquitine. Puis, l'ubiquitin est transférée à la E2 ubiquitin-conjugating enzyme qui permet d'amener l'ubiquitine et la E3 ubiquitin-protein ligase à la protéine d'intérêt. Finalement, la E3 ubiquitin-protein ligase permet le transfert de l'ubiquitine de l'enzyme E2 à la protéine d'intérêt. La plupart des organismes ont une seule enzyme E1 mais plusieurs enzymes E2 et E3, qui permettent la spécificité (Pickart, 2001b). Il existe aussi des enzymes associées au protéasome qui permettent la déubiquitination, nécessaire pour l'entrée du substrat dans le protéasome et ce processus permet aussi de recycler l'ubiquitine (Pickart, 2001b).

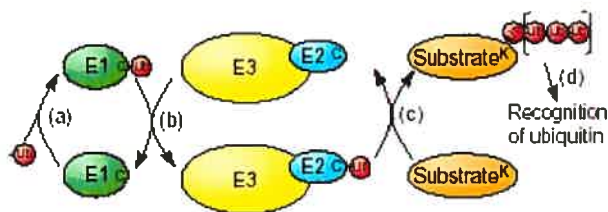


Figure 5 : Processus d'ubiquitination

La E1 ubiquitin-activating enzyme forme un lien thiol ester avec la glycine 76 de l'ubiquitine. Puis, l'ubiquitine est transférée à la E2 ubiquitin-conjugating enzyme qui permet d'amener l'ubiquitine et la E3 ubiquitin-protein ligase à la protéine d'intérêt. Finalement, la E3 ubiquitin-protein ligase permet le transfert de l'ubiquitine de l'enzyme E2 à la protéine d'intérêt (Pickart, 2001a).

Finalement, la protéine est dégradée par les 26S protéasomes cytosoliques et cette réaction nécessite de l'ATP. Le protéasome est un complexe de 2MDa formé de une ou deux sous-unités appelées cap 19S, qui est la partie régulatrice du protéasome, et d'une sous-unité appelée corps 20S, qui comprend la partie protéolytique (Coux et al., 1996;DeMartino and Slaughter, 1999;Voges et al., 1999;Zwickl et al., 2001). La sous-unité cap 19S contient des protéines AAA ATPase (ATPases Associated with multiple cellular Activities) qui permettent la liaison à la chaîne d'ubiquitines (Deveraux et al., 1994;Lam et al., 2002), la dénaturation du polypeptide (Braun et al., 1999;Liu et al., 2002;Strickland et al., 2000), l'ouverture du corps 20S (Kohler et al., 2001), l'entrée du polypeptide dans le corps 20S (Lee et al., 2001) et la déubiquitination (Yao and Cohen, 2002). Par exemple, une de ces AAA ATPase typique, nommée p97 chez les mammifères, contient deux sites de liaison à l'ATP et un site de liaison pour l'ubiquitine (Dai and Li, 2001;Peters et al., 1990). La protéine p97 permet le couplage entre la rétrotranslocation et la dégradation puisqu'elle procure l'énergie nécessaire pour la rétrotranslocation et le ciblage au protéasome (Bays and Hampton, 2002). Donc, la rétrotranslocation est tout de même possible en l'absence de protéasomes

fonctionnels si p97 n'est pas affecté car le protéasome serait nécessaire au relâchement du substrat de la membrane du réticulum endoplasmique (Elkabetz et al., 2004). De plus, p97 lie la protéine avant même que celle-ci soit ubiquitinée mais l'ubiquitination est nécessaire à l'extraction (Wojcik et al., 2004). Cependant, p97 est nécessaire seulement dans le cas des protéines qui doivent être ubiquitinées puisque certaines protéines non-ubiquitinées n'interagissent avec p97. Les protéines non-ubiquitinées peuvent être ciblées au protéasome de différentes façons, par exemple grâce à une protéine accessoire ou un signal dans l'extrémité carboxyl (Orlowski and Wilk, 2003). Dans certains cas, le mécanisme demeure inconnu. Cette dégradation par le protéasome est concomitante à la translocation (Mayer et al., 1998; Plemper et al., 1998; Xiong et al., 1999). Récemment, il fut démontré que dans certains cas le protéasome serait suffisant pour la rétrotranslocation de la protéine dans le cytosol et sa dégradation mais que ces deux activités seraient indépendantes puisque le cap19S en présence d'ATP permet la rétrotranslocation et le corps 20S permet la dégradation protéolytique (Lee et al., 2004).

1.1.4 Chaperons spécifiques

Le contrôle de qualité du réticulum endoplasmique est très complexe et en plus des systèmes généraux décrits précédemment, il comporte aussi un contrôle de qualité plus spécifique à certaines protéines. Ces chaperons ont leur propre mécanisme de reconnaissance. Ils interagissent souvent plus tard lors du repliement et peuvent même maintenir leur interaction avec les protéines une fois bien repliées. Il existe une multitude de ces chaperons (Ellgaard et al., 1999) mais voici quelques exemples.

La protéine NinaA est une enzyme de la famille des peptidyl –propyl *cis/trans* isomerase qui assure le transport à la surface cellulaire d'un récepteur couplé aux protéines G, la rhodopsine, chez la drosophile (Stamnes et al., 1991). De même, la protéine RAP (receptor-associated protein) lie les membres de la familles des LDLR (low density lipoprotein-receptor) dans le réticulum endoplasmique et les escorte jusqu'au Golgi afin d'éviter la liaison précoce du ligand (Bu, 2001). D'autre part, la protéine ERGIC-53 (endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment) agit comme un récepteur permettant le transport entre le réticulum endoplasmique et le Golgi pour certaines protéines glycosylées comportant plusieurs mannose (Appenzeller et al., 1999;Nichols et al., 1998).

D'autre part, la protéine RAMP (receptor activity-modifying protein), dont trois sous-types existent (RAMP1, 2 et 3), est un chaperon différent des précédents puisque la liaison entraîne un changement dans la pharmacologie de la protéine qu'elle escorte (McLatchie et al., 1998). Cette protéine à un domaine transmembranaire lie un récepteur couplé aux protéines G, le CRLR (Calcitonin Receptor Like Receptor). En l'absence de cette liaison, les protéines RAMP voyagent entre le réticulum endoplasmique et le Golgi tandis que le CRLR n'atteint pas la membrane plasmique. Cependant, lorsque RAMP lie le CRLR, celui-ci peut maintenant être bien acheminé à la membrane. Selon le sous-type de RAMP qui va s'associer, le récepteur lie un ligand différent. C'est-à-dire, lorsque la protéine RAMP1 agit comme chaperon, le CRLR va lier le CGRP (calcitonin gene-related peptide) tandis que si RAMP2 ou 3 lie le CRLR, le récepteur va lier l'adrénoméduline (Aldecoa et al., 2000;Leuthauser et al., 2000).

Un dernier exemple est la protéine DRiP78 (Dopamine receptor interacting protein) qui lie certains récepteurs couplés aux protéines G. DRiP78 est une protéine membranaire résidente du réticulum endoplasmique qui lie une séquence hydrophobe, FxxxFxxxF, au niveau de l'extrémité C-terminal des récepteurs. Certains groupes suggèrent que cette séquence régule l'export des récepteurs du réticulum endoplasmique (Bermak et al., 2001) tandis que d'autres suggèrent que ce motif soit important pour le repliement (Krause et al., 2000). La surexpression de DRiP78 entraîne la rétention du récepteur de la dopamine D1 et du récepteur muscarinique M2 (Bermak et al., 2001; Bermak and Zhou, 2001). Il avait donc été suggéré que le fait de masquer le signal d'export par une protéine accessoire entraîne une rétention. Cependant, dans le cas du récepteur de l'angiotensine AT_{1A}, lors de la surexpression de DRiP78, il y a augmentation de l'export (Leclerc et al., 2002). Comme ces résultats sont contradictoires, le rôle exact de DRiP78 dans la maturation de ces récepteurs n'est pas très clair.

1.1.5 Agrégation

Certaines protéines sont retenues dans le réticulum endoplasmique car elles forment de gros agrégats irréversibles plutôt que d'être dégradées par la machinerie de dégradation décrite précédemment. Un des processus de l'agrégation implique un changement structural de la protéine par la formation de feuillets β , qui est une structure très stable et irréversible (Gazit, 2002). Ce type d'agrégation, pouvant être causé par l'âge ou un agent infectieux, entraîne plusieurs pathologies, telles l'alzheimer, le parkinson, la maladie du prion et d'autres amyloïdoses (tableau 2) (Gazit, 2002; Kopito and Ron, 2000). La raison de l'absence d'export

n'est pas claire mais il se pourrait que la taille ne permette pas l'export ou diminue la mobilité empêchant les agrégats d'atteindre les sites d'export. Il a aussi été proposé que les chaperons moléculaires et les autres protéines résidentes du réticulum endoplasmique formeraient un réseau visqueux et interconnecté réduisant la mobilité des agrégats (Booth and Koch, 1989; Sambrook, 1990). Effectivement, des études démontrent que certaines protéines mal repliées sont immobiles dans le réticulum endoplasmique (Nehls et al., 2000). Souvent, ces agrégats incluent des chaperons moléculaires, tels BiP, GRP94 et PDI (Fabunmi et al., 2000; Molinari et al., 2002; Wigley et al., 1999; Wojcik et al., 1996). La présence de PDI peut entraîner la formation de plusieurs ponts disulfures non-désirés stabilisant davantage l'agrégat (Molinari et al., 2002).

Le plus grand problème est que ces agrégats sont toxiques pour la cellule, entraînant certaines maladies (tableau 2). La cellule tentera donc de détruire ces agrégats (Kopito and Ron, 2000). Dans certains cas, les agrégats s'accumulent dans une extension dilatée du réticulum endoplasmique où il est possible de voir l'apparition de plusieurs autophagosome (Kopito and Ron, 2000). Dans d'autres cas, les protéines mal repliées s'accumulent dans des vésicules dérivées du réticulum endoplasmique, les corps de Russell, qui sont structurellement très similaires aux autophagosomes (Kopito and Ron, 2000). Ces études suggèrent que l'autophagocytose soit le moyen emprunté par la cellule afin d'éliminer les agrégats toxiques.

1.1.6 Export des protéines du réticulum endoplasmique

Lorsqu'une protéine est bien repliée, elle peut être exportée du réticulum endoplasmique jusqu'au Golgi grâce au complexe COPII (coat protein complex II) (Figure 6) (Aridor and Traub, 2002; Barlowe et al., 1994; Gorelick and Shugrue, 2001). Le complexe COPII est composé de trois composantes cytosoliques, soit le sec23/sec24, le sec13/sec31 et la petite GTPase Sar1 (Aridor and Traub, 2002). L'échange du GDP en GTP de Sar1 est médié par la protéine sec12. Une fois que Sar1 est lié au GTP (Barlowe and Schekman, 1993), elle recrutera sec23/sec24, qui pourront le lier à la couche bilipidique de la membrane. Ensuite, sec13/31 sera également recruté au site d'export (Aridor et al., 2001; Matsuoka et al., 1998). La formation de plusieurs complexes COPII permettra la formation d'une vésicule qui va bourgeonner de la membrane. Lors du bourgeonnement, d'autres protéines se lieront au complexe de COPII afin de compléter la machinerie de fusion, telles les protéines SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) (Ungar and Hughson, 2003), et de permettre le bon ciblage, telles les protéines Rab (Deneka et al., 2003; Seachrist and Ferguson, 2003). Finalement, cette vésicule sera transportée au Golgi et fusionnée avec la membrane du Golgi.

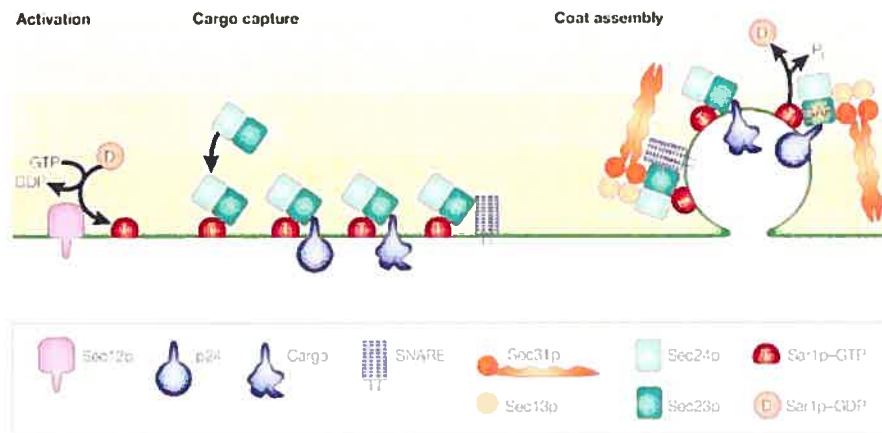


Figure 6 : Formation de vésicules COPII

La protéine sec12 médie l'échange du GDP en GTP de Sar1. La protéine Sar1-GTP recrute au site d'export sec23/sec24, qui vont recruter les SNAREs et finalement sec13/31 afin de permettre le bourgeonnement (Aridor and Traub, 2002).

Le recrutement au site d'export des protéines, qui doivent être acheminées au Golgi, se fait grâce à la reconnaissance d'un motif d'export. Deux classes de ce type de motif ont été décrites. La première classe comprend des acides aminés hydrophobiques et aromatiques dans l'extrémité carboxyle, tels 2 phénylalanine (Nufer et al., 2002) ou une simple valine (Iodice et al., 2001). La deuxième classe, quant à elle, comprend de petites séquences d'acides aminés contenant une séquence interne diacide (EXD) (Ma et al., 2001; Ma et al., 2002; Nishimura and Balch, 1997). Ces séquences peuvent lier le sec23/sec24 dans le cytosol et permettent la formation du complexe COPII. Naturellement, la protéine doit atteindre la bonne conformation pour que son site d'export soit bien exposé. Cependant, dans certains cas, aucun motif d'export n'a été identifié.

1.2 Contrôle de qualité du cytosol

En plus des mécanismes de contrôle de qualité du réticulum endoplasmique, certains chaperons moléculaires cytoplasmiques peuvent aussi contribuer au bon repliement des protéines membranaires. En effet, il fut démontré que les chaperons moléculaires cytoplasmiques, telles Hsp70 et deux Hsp40 (HSJ1a et HSJ1b), peuvent assister le repliement des boucles cytoplasmiques d'une protéine membranaire (Chapple and Cheetham, 2003).

1.3 Contrôle de qualité du Golgi

Lorsque les protéines arrivent au niveau du Golgi, elles sont triées selon leurs différents sites d'action, soit la membrane plasmique, les vésicules de sécrétions, le lysosome, etc. Ce processus est très rapide car les protéines passent environ 5 à 15 minutes au niveau du Golgi (Helenius and Aebi, 2001).

Malgré le fait que la plus grande partie du contrôle de qualité se fait au niveau du réticulum endoplasmique, il semble que le Golgi y participe. Par exemple, si une protéine mal repliée s'échappe du réticulum endoplasmique, une fois dans le Golgi, elle sera renvoyée dans le réticulum endoplasmique grâce à plusieurs protéines, telles, BiP, les protéines du complexe COPI et les récepteurs du KDEL (Letourneur et al., 1994). Malgré l'absence de protéines chaperons spécifiques au Golgi, la localisation de certains des chaperons, normalement dans le réticulum endoplasmique, au niveau du ERGIC (ER-Golgi

intermediate compartment), suggère la possibilité de repliement des protéines dans ce compartiment.

De plus, le Golgi permet aussi la modification des sucres qui furent ajouté sur la protéine lors de sa synthèse dans le réticulum endoplasmique. Les premières modifications se font au niveau du réticulum endoplasmique, tel que décrit dans la section « Le complexe calnexine/calréticuline ». Une fois dans le Golgi, plusieurs sucres sont une fois de plus enlevés et d'autres sucres sont ajoutés. Le complexe de sucres final, pouvant varier selon la protéine, sera plus gros et donc entraînera un changement de poids de la protéine, ce qui permet d'ailleurs de suivre sa maturation.

Chapitre 2

Diabète insipide néphrogénique et physiologie rénale

Une des maladies conformationnelles mentionnées précédemment et faisant l'objet de cette thèse est le diabète insipide néphrogénique. C'est une maladie rare, qui est caractérisée par une résistance des reins face à l'action de l'hormone antidiurétique, soit l'arginine vasopressine.

2.1 Anatomie et physiologie rénale

Les reins traitent quotidiennement environ 180 litres de liquide en provenance du sang et seulement 1,5 litres d'urine sera excrété. Les reins sont composés de plus d'un million de néphrons qui sont formés de la capsule glomérulaire (capsule de Bowman), du glomérule rénal et un système tubulaire. La formation de l'urine comprend trois étapes, soit la filtration glomérulaire, la réabsorption tubulaire et la sécrétion tubulaire.

La filtration glomérulaire est un processus passif et non sélectif au cours duquel les liquides et les solutés sont poussés à travers les membranes des capillaires glomérulaires (fenestrés) par la pression hydrostatique pour se retrouver dans la capsule glomérulaire. La réabsorption tubulaire est un mécanisme de transport transépithélial actif ou passif qui permet la concentration de l'urine, où l'osmolarité urinaire peut atteindre jusqu'à 1200 mOsm/kg (Figure 7). Le transport de l'eau à travers la membrane ne se fait heureusement pas de façon active, ce qui nécessiterait une quantité incroyable d'énergie, mais plutôt grâce à un système de contre-courant dû à l'arrangement entre le système tubulaire du néphron et le système vasculaire entourant celui-ci. Alors les nutriments organiques, tels le glucose et les acides aminés, l'eau et les ions peuvent être réabsorbés à différents endroits dans le système

tubulaire du néphron, soit le tubule contourné proximal (~65% du filtrat glomérulaire absorbé), l'anse du néphron (~15-35% du filtrat glomérulaire restant absorbé), le tubule contourné distal et le tubule rénal collecteur.

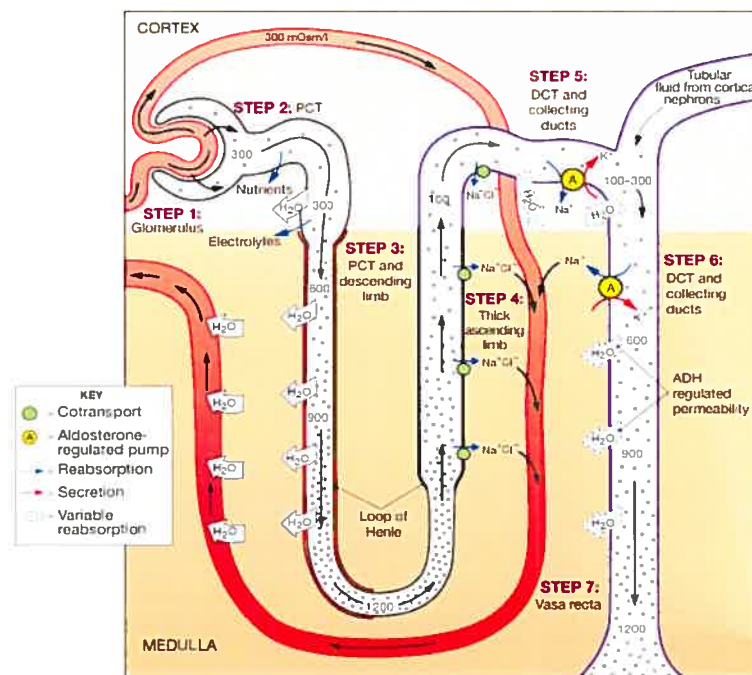


Figure 7 : Schématisation d'un néphron et concentration de l'urine.

Les liquides et solutés sont poussés dans la capsule glomérulaire (1). Le filtrat glomérulaire est acheminé dans le tubule contourné proximal (2), dans l'anse descendante (3) et ascendante (4) du néphron, dans le tubule contourné distal (4) et finalement dans le tubule collecteur (6).

La perméabilité à l'eau de la membrane est fonction de la présence et de l'abondance des pores aqueux, soit les aquaporines. Pendant longtemps, la diffusion simple était le seul mécanisme connu du transport de l'eau à travers toutes les membranes biologiques. Cependant, cette diffusion est très lente et les canaux à eau permettent d'augmenter de 10 à

100 fois la perméabilité de la membrane. De plus, la découverte des aquaporines a permis d'expliquer les différences de perméabilité des membranes et le passage spécifique de l'eau dans certaines membranes. Les aquaporines fournissent une voie d'accès à l'eau dans les cellules.

La première reconnaissance de l'existence des pores aqueux dans la membrane plasmique provient d'anciennes études biophysiques sur des globules rouges où des mouvements de l'eau selon l'osmolarité avait été démontré (Paganelli and Solomon, 1957; Sidel and Solomon, 1957). Plusieurs années plus tard, le premier canal à eau fut identifié de façon accidentelle par le groupe de Peter Agre (Denker et al., 1988; Preston et al., 1992; Preston and Agre, 1991; Smith and Agre, 1991). En effet, ils ont isolé une protéine membranaire de 28 kDa très abondante dans les globules rouges et le tubule rénal proximal (deux tissus très perméables à l'eau), qu'ils ont nommé CHIP28 (channel-forming integral membrane protein) (Denker et al., 1988). Lorsqu'ils ont micro-injecté cette protéine dans des oocytes de *Xenopus laevis*, la perméabilité de la membrane a été augmentée et cette augmentation a été inhibée par le chlorure de mercure (Preston et al., 1992) car celui-ci interagit avec les groupements sulfhydryl et les ponts disulfures. La séquence de l'extrémité NH₂ de cette protéine purifiée fut utilisée pour cloner l'ADNc à partir d'une banque d'ADN de foie. L'analyse de cette séquence d'ADN a révélé que cette protéine comprenait six passages transmembranaires dont les extrémités NH₂ et COOH étaient dans le cytosol (Preston and Agre, 1991). Par la suite, l'aquaporine-1 fut cristallisée permettant de confirmer sa structure (Sui et al., 2000). De plus, il fut démontré que ce canal à eau dans la membrane existe en tant qu'homotétramère dont une des quatre sous-unités serait glycosylée (Smith and Agre, 1991).

Cette protéine est maintenant connue sous le nom d'aquaporine-1 (Agre et al., 1993) et à ce jour, 13 aquaporines ont été identifiées et caractérisées chez les mammifères (Noda and Sasaki, 2004). Elles sont exprimées dans différents types cellulaires épithéliaux et endothéliaux impliqués dans le transport des liquides leur suggérant des rôles différents. Elles sont si sélectives que même la forme protonée de l'eau ne peuvent les traverser (Agre et al., 2002). Trois milliards de molécules d'eau par seconde, et par monomère d'aquaporine, peuvent traverser la membrane. Parmi ces neuf aquaporines, six sont exprimées au niveau du rein à différents endroits dans le néphron.

2.1.1 Tubule contourné proximal

Au niveau du tubule contourné proximal, il y a réabsorption de glucose et de solutés organiques par co-transport actif (dépendant de l'ATP) avec le sodium et donc création d'un gradient électrochimique facilitant le transport de l'eau et certains ions par osmose. Ce passage de l'eau ici est rendu possible grâce aux aquaporines-1 qui sont très exprimées autant sur la membrane apicale que sur la membrane basolatérale (Nielsen et al., 1993b).

2.1.2 Anse descendante du néphron

Dans la partie descendante de l'anse du néphron (ou anse de Henle), il y a toujours une grande réabsorption d'eau toujours due à la présence d'aquaporines-1. Dans la dernière partie de l'anse du néphron et dans la loupe, il y a aussi des transporteurs d'urée (UT2) qui

permettent l'excrétion d'urée car la concentration est moins grande que dans le liquide interstitiel (Shayakul et al., 2000).

2.1.3 Anse ascendante du néphron

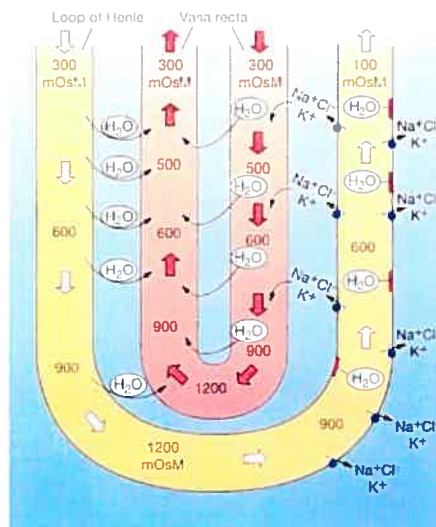


Figure 8 : Système de contre-courant

L'entrée de NaCl dans la vasa recta permet d'augmenter l'osmolarité nécessaire au système contre-courant afin de permettre ensuite l'entrée d'eau.

Par la suite, dans l'anse ascendante du néphron, qui comprend une partie plus mince et une partie plus épaisse, la membrane est imperméable à l'eau due à l'absence d'aquaporines. Toutefois, il y a dilution des solutés d'abord par la réabsorption du chlore par son transporteur CLC-K1 dans la partie plus mince (Kere, 1999) puis dans la partie plus large, par la forte réabsorption de NaCl par un co-transporteur $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$, le NKCC2 (Hebert, 1998). Puis le potassium sera recyclé dans l'urine par un canal à potassium. Cette entrée de NaCl dans la vasa recta, un lit de capillaires additionnels qui permettent de créer un

gradient osmotique, va permettre d'augmenter l'osmolarité nécessaire au système contre-courant (Figure 8).

2.1.4 Tubule contourné distal

À ce niveau, il y a absorption active du sodium en réponse à l'aldostérone qui va entraîner une absorption d'ions due gradient électrochimique. En fait, l'aldostérone permet une augmentation de l'expression des pompes à sodium à la membrane.

2.1.5 Tubule rénal collecteur

Bien qu'il n'y ait pas d'aquaporine-1 dans le tubule rénal collecteur, le fait que la vasopressine pouvait réguler le transport de l'eau, laissait croire l'existence d'autres canaux à eau. En accord avec cette hypothèse, l'ADN complémentaire de l'aquaporine-2 a été isolée en utilisant une banque d'ADN du tubule rénal collecteur à partir d'un oligonucléotide comprenant le motif NPA (Fushimi et al., 1993). Par la suite, il a été démontré que la vasopressine menait à la translocation des aquaporines-2 dans la membrane apicale par l'activation du récepteur V2 de la vasopressine (Figure 9).

Plus en détails, la vasopressine lie le récepteur V2 de la vasopressine présent dans la membrane basolatérale entraînant une cascade de signalisation. En fait, le récepteur provoque un changement de conformation de la protéine G hétérotrimérique, qui activera son effecteur, l'adénylate cyclase, pour permettre la formation d'AMP cyclique et stimuler la

PKA (protéine kinase A). Ensuite, la PKA mène à la phosphorylation de l'aquaporine-2 et sa translocation à la membrane apicale conduisant à l'augmentation de la perméabilité de la membrane à l'eau (Morello and Bichet, 2001). Ensuite, les aquaporines-3 et 4, qui sont exprimées de façon constitutive, permettent le passage de l'eau dans la membrane basolatérale pour atteindre le liquide interstitiel. La vasopressine régule aussi un transporteur de l'urée, UT1, qui est principalement exprimé vers la fin du tubule rénal collecteur, en réponse à la PKA (Shayakul et al., 1996). De plus, la vasopressine peut réguler l'absorption du sodium en augmentant l'expression de pompe à sodium à la membrane aussi en réponse à la PKA. (Ward et al., 1999). Il semble aussi que la vasopressine active des récepteurs V1a de la membrane apicale ce qui induit la formation des prostaglandines qui réduisent l'accumulation d'AMP cyclique, afin de limiter les effets anti-diurétiques de la vasopressine (Bankir, 2001). Donc, en l'absence de vasopressine, le tubule rénal collecteur démontre peu de perméabilité à l'eau, l'urée et le sodium. À ce niveau, il y a encore absorption du sodium en réponse à l'aldostérone, créant un gradient électrochimique qui permet le transport passif d'autres ions.

En plus des actions sur l'équilibre hydrique décrit plus haut, la vasopressine est aussi impliquée dans d'autres processus biologiques, tels la sécrétion de l'ACTH (adrenocorticotropie hormone), l'augmentation de la pression sanguine, la prolifération cellulaire, l'agrégation plaquettaire et la sécrétion du facteur de coagulation. Comme seul l'effet de la vasopressine sur l'équilibre hydrique est l'objet de cette thèse, la vasopressine et son récepteur V2 ainsi que l'aquaporine-2 seront vu plus en détail dans les prochaines sections.

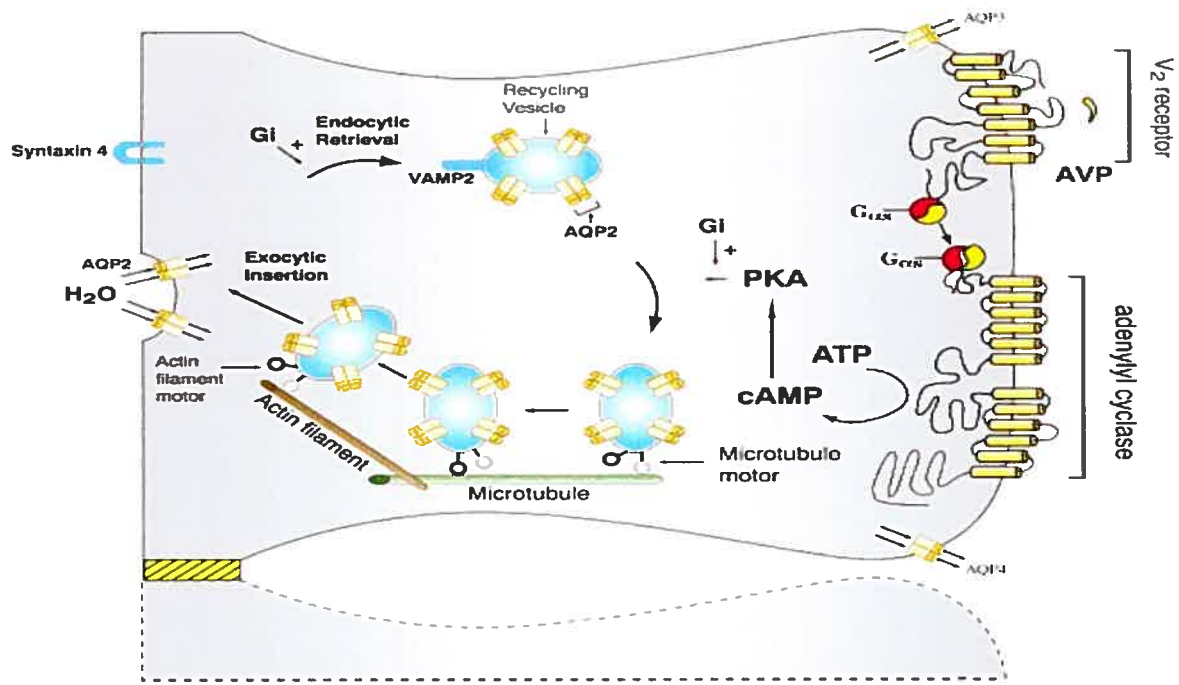


Figure 9 : Représentation schématique d'une cellule du tubule rénal collecteur.

L'activation du récepteur V2 de la vasopressine par son ligand entraîne la stimulation de la protéine G qui modulera son effecteur l'adénylate cyclase afin de produire de l'AMP cyclique à partir de l'ATP. Cette accumulation d'AMP cyclique activera la PKA qui va permettre la phosphorylation des aquaporines-2 et leur translocation à la membrane apicale.

2.1.5.1 La vasopressine

La vasopressine, un peptide cyclique de neuf acides aminés (Figure 10), est synthétisée dans les neurones magnocellulaires du noyau supraoptique et paraventriculaire de l'hypothalamus sous la forme d'un grand précurseur (Riddell et al., 1985). Effectivement, le gène *prepro-AVP-NP11*, localisé sur le chromosome 20, est responsable de trois peptides en plus d'un peptide signal, soit la vasopressine, la neurophysine II (le transporteur de la vasopressine) et une glycoprotéine dont la fonction est inconnue (Riddell et al., 1985). Suite

au clivage du peptide signal, la pro-hormone est emmagasinée dans les granules de neurosécrétion de la neurohypophyse où elle va être convertie en vasopressine et neurophysine II pour finalement être sécrétée aux extrémités de l'axone dans l'hypophyse (Dreifuss, 1975; Sachs et al., 1969). Alors, la vasopressine est libérée dans le sang, à un taux plasmatique de l'ordre de 10^{-12} M, afin de pouvoir interagir avec ses récepteurs à divers endroits. La régulation de la sécrétion de la vasopressine se fait par deux mécanismes. Le premier mécanisme, très sensible, est dépendant des osmorécepteurs, présents dans les neurones magnocellulaires, qui détectent les changements d'osmolarité (Bourque et al., 1994; Bourque and Oliet, 1997). Par exemple, une hypertonicité entraînera une dépolarisation de la membrane qui permettra la sécrétion de la vasopressine. Le deuxième mécanisme est dépendant de grands changements dans le volume sanguin et la pression artérielle détecté par des barorécepteurs (Chowdrey and Lightman, 1993).

COOH - Cys - Tyr - Phe - Gln - Asn - Cys - Pro - Arg - Gly - NH₂

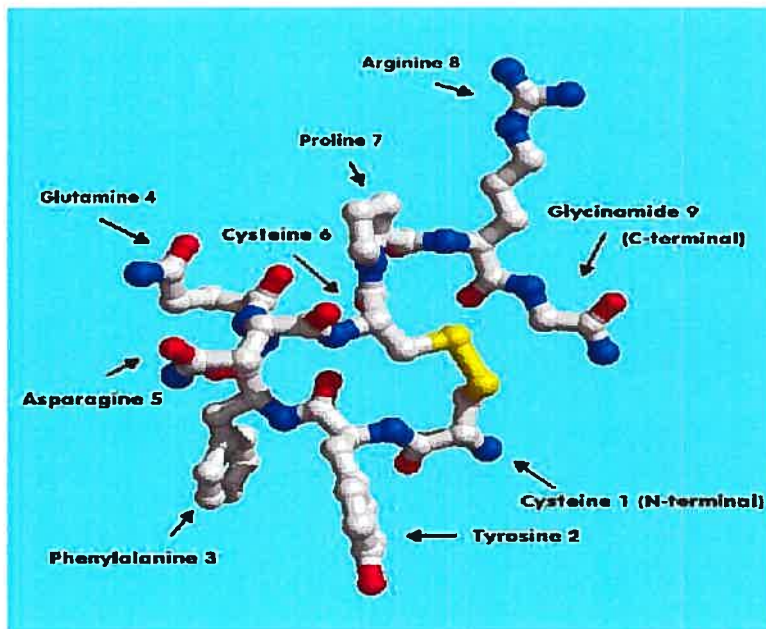


Figure 10 : Structure tridimensionnelle de la vasopressine.

2.1.5.2 Le récepteur V2 de la vasopressine

Il existe trois types de récepteurs pour la vasopressine, soit V1a, V1b (ou V3) et V2 qui font tous partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Ils sont tous très similaires autant en longueur qu'au niveau de leur séquence. Néanmoins, les récepteurs V1a et V1b interagissent avec les protéines G de la famille $G_{q/11}$ alors que le récepteur V2 couple aux protéines G_s . De plus, les récepteurs V1a et le V1b se retrouvent dans plusieurs organes, tels le foie, le cerveau, reins, hypophyse, utérus, cœur, poumons, alors que le récepteur V2 se retrouve presque exclusivement sur la surface basolatérale des cellules principales du tubule rénal collecteur (Antoni, 1984).

Le récepteur V2 (Figure 11), cloné en 1992, est le récepteur responsable du contrôle de la réabsorption de l'eau en réponse à la vasopressine au niveau des cellules principales du tubule rénal collecteur (Birnbaumer et al., 1992). Cette protéine de 371 acides aminés comprend sept passages transmembranaires, caractéristiques des récepteurs couplés aux protéines G. Cependant, comme ce récepteur n'est toujours pas cristallisé, toutes propositions sur sa conformation sont basées sur la structure de la rhodopsine, qui fut cristallisée (Palczewski et al., 2000).

Le site de liaison pour la vasopressine se situe à l'intérieur du récepteur V2 entre les hélices 2 et 7 et permet de complètement engouffrer la vasopressine dans une poche d'environ 15-20 Å (Mouillac et al., 1995). Contrairement à l'ensemble des acides aminés de la vasopressine qui lient les passages transmembranaires, l'arginine en position 8 de la vasopressine peut interagir avec une boucle extracellulaire du récepteur, soit la deuxième

boucle à la position 103 (acide aspartique). D'ailleurs, il semble que ce soit cet acide aminé qui permet la sélectivité entre les sous-types de récepteurs de la vasopressine car dans le cas des récepteurs V1a, cet acide aspartique est remplacé par une tyrosine (Chini et al., 1995).

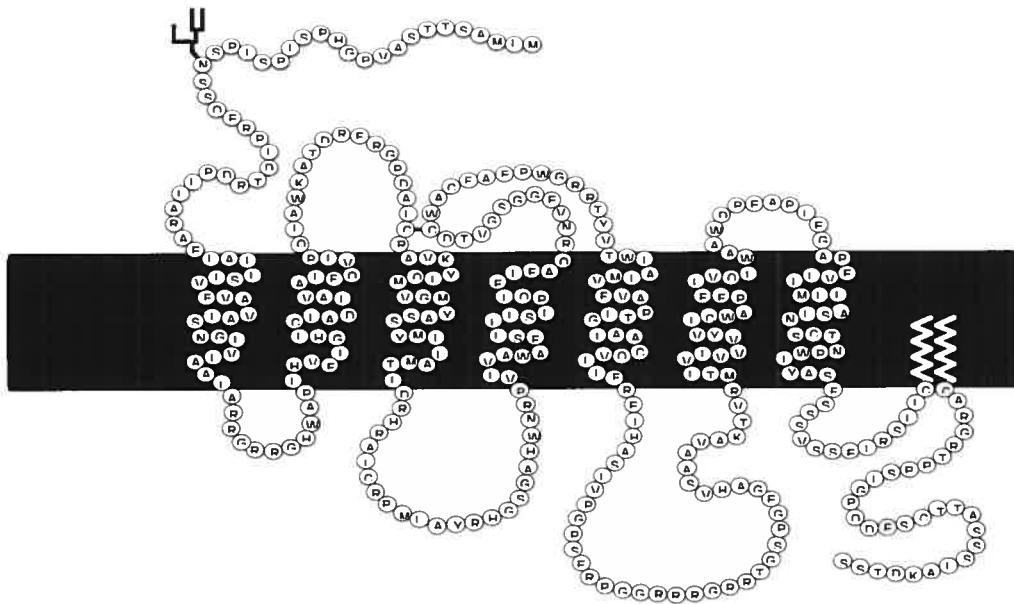


Figure 11 : Représentation schématique du récepteur V2 de la vasopressine humain.

Il semble que le récepteur V2 contiennent des signaux de localisation autant pour la membrane apicale, présent dans la queue C-terminal, que basolatérale, dans la 2^e boucle intracellulaire (Hermosilla and Schulein, 2001). Cependant, le signal pour la membrane basolatérale serait dominant.

2.1.5.3 L'aquaporine-2

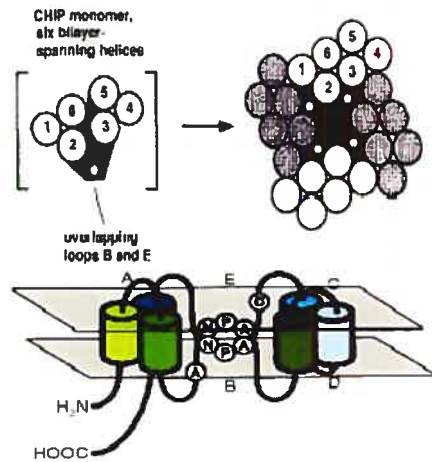


Figure 12 : Arrangement de l'aquaporine-2 dans la membrane

L'aquaporine-2 est sous forme de tétramère dans la membrane où chaque aquaporine a son propre canal. Ce canal contient deux motifs NPA permettant seulement le passage des molécules d'eau (Jung et al., 1994).

L'aquaporine-2 existe sous la forme d'un tétramère où chacune des sous-unités (271 acides aminés) contient son propre canal (Figure 12) qui permet le passage de l'eau contrairement aux canaux à ions dont les quatre sous-unités forment un canal central (Jung et al., 1994). Deux motifs Asparagine-Proline-Alanine (NPA), très conservés chez les aquaporines, sont orientés à 180° l'un de l'autre et fournissent les résidus polaires (N) pour les liaisons hydrogènes permettant l'accès à une seule molécule d'eau à la fois (Figure 12) (Jung et al., 1994). En plus, la fin du canal comprenant les boucles B et E forme des petites hélices alpha qui vont créer une charge positive au centre de la membrane qui, combinée avec une arginine et une histidine, permettront de créer une forte charge pour repousser les protons lors du passage de l'eau (de Groot and Grubmuller, 2001). Ce passage spécifique de l'eau permet d'expliquer comment le rein peut réabsorber des centaines de litres d'eau et

excréter des acides. La structure de l'aquaporine-2, basée sur la structure cristallisée de l'aquaporine-1 (Sui et al., 2000), semble aussi s'appliquer à d'autres aquaporines, telles les aquaporines-3 et -5 alors que, par exemple, l'aquaporine-4 semble former un plus grand oligomère.

Il semble que les aquaporines-2 se retrouvent seulement dans les cellules principales du tubule rénal collecteur (Nielsen et al., 1993a; Nielsen et al., 1995). Il a été démontré que les aquaporines-2 sont principalement situées dans des vésicules intracellulaires à l'état basal et que la vasopressine entraîne leur redistribution à la membrane apicale et une augmentation de cinq fois de la perméabilité à l'eau de cette membrane (Nielsen et al., 1995). La stimulation par la vasopressine des récepteurs V2 de la vasopressine par une cascade d'activation décrite précédemment permet l'activation de la PKA. Les aquaporines-2 ont un site consensus pour la PKA (RRQS) dans l'extrémité COOH dont la sérine (position 256) est rapidement phosphorylée, en moins d'une minute suite à l'activation du récepteur (Christensen et al., 2000; Nishimoto et al., 1999). Ce temps concorde bien avec le temps que prend la vasopressine pour augmenter la perméabilité de la membrane (Wall et al., 1992). Cependant, le groupe de Valenti a démontré que la sérine 256 serait aussi phosphorylée par une autre kinase, soit la G-CK (Golgi apparatus casein kinase) (Procino et al., 2003). Le site consensus pour cette kinase (RRQSVEL), dont le caractère acide du E serait très important, se retrouve au même endroit que le site pour la PKA (RRQS). L'étude des mutants de l'aquaporine-2 S256A et E258K suggère que la phosphorylation par la G-CK soit nécessaire pour le transport entre le Golgi et les vésicules intracellulaires et que la PKA serait nécessaire pour la translocation vers la membrane (Procino et al., 2003). Toutefois, ils ont démontré qu'en bloquant l'internalisation, il y a accumulation d'aquaporine-2 et d'aquaporine-2

mutante (S256A) à la membrane indépendamment des récepteurs de la vasopressine et de la phosphorylation. Ces études démontrent que les aquaporines seraient recyclées rapidement et constitutivement entre la membrane apicale et les vésicules intracellulaires (Lu et al., 2004).

Il semble qu'un traitement soutenu avec la vasopressine régule aussi le nombre d'aquaporines-2 dans la cellule (Knepper, 1997). En effet, un traitement à long terme avec la dDAVP pendant cinq jours ou une privation d'eau pendant 24 à 48 heures entraîne l'augmentation de la quantité d'aquaporines-2 et la perméabilité à l'eau de la membrane (DiGiovanni et al., 1994;Nielsen et al., 1993a). Cet effet serait dû à la régulation de la transcription de l'aquaporine-2 par la présence d'un CRE (cAMP response element) dans son promoteur. Alors, l'élévation de l'AMPc en réponse à la vasopressine va activer la PKA qui va phosphoryler CREB dans le noyau. CREB phosphorylé va pouvoir lier l'élément CRE pour favoriser la transcription de l'aquaporine-2 (Hozawa et al., 1996). Toutefois, il semble que l'expression de l'aquaporine-2 peut aussi être régulée indépendamment de la vasopressine mais ces mécanismes ne sont pas très connus (Nielsen et al., 1999).

2.2 Diabète insipide néphrogénique congénital

L'absence de la concentration de l'urine entraîne un diabète insipide, dont plusieurs types existent. Le diabète insipide peut être neurogénique (ou central) s'il est entraîné par un problème au niveau de la sécrétion de la vasopressine. Cette forme peut être acquise ou congénitale, dû à des mutations dans le gène de la *prepro-AVP-NPII* (Ito et al., 1993;Rittig et al., 1996). Dans ce cas, l'administration de dDAVP, un analogue de la vasopressine, permet

au patient de surmonter la pathologie. Le diabète insipide peut aussi être néphrogénique, acquis ou congénital une fois de plus. La forme acquise, qui est plus commune quoique moins sévère, peut être causée par divers facteurs dont le plus commun est un traitement au lithium, administré aux patients atteints de désordres affectifs (Peet and Pratt, 1993). En fait, le lithium entraînera la régulation négative de l'ARNm de l'aquaporine-2 et de la pompe à sodium et potassium $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ (Laursen et al., 2004). La forme congénitale quant à elle provient de mutations soit dans le gène du récepteur V2 ou de l'aquaporine-2 et le dDAVP n'a aucun effet positif.

Le diabète insipide néphrogénique congénital est rare et lié au chromosome X. Ce dérèglement entraîne une incapacité des reins à concentrer l'urine, menant à une osmolarité urinaire maximale de moins de 300mOsm/kg, et ce indépendamment de la concentration circulante de vasopressine (Morello and Bichet, 2001). Les manifestations de cette maladie génétique sont présentes dès les premières heures de la vie. Les principaux symptômes sont une déshydratation sévère, de la fièvre, des vomissements et de la constipation (Morello and Bichet, 2001). La déshydratation persistante peut entraîner des retards mentaux et même la mort en l'absence de traitement adéquat. Un diagnostic rapide suivi d'un traitement qui assure un bon apport d'eau est donc essentiel pour ces patients (Morello and Bichet, 2001). À ce jour, aucun traitement pharmacologique spécifique n'est connu et seul l'absorption de grande quantité d'eau avec une diète faible en sodium assure un développement normal des enfants atteints (Blalock et al., 1977). De plus, les patients peuvent prendre des hydrochlorothiazides et de l'indométhacine afin de réduire l'excrétion de l'eau (Jakobsson and Berg, 1994).

2.2.1 Mutations du récepteur V2 de la vasopressine

Chez environ 90% des patients, le diabète insipide néphrogénique est causé par des mutations dans le récepteur V2 de la vasopressine. Comme le récepteur V2 est présent sur le chromosome X (Xq28), presque tous les patients sont des mâles, avec une incidence estimée à 1 pour 152 000 naissances mâles (Arthus et al., 2000). Cependant, en Nouvelle-Écosse et au Nouveau-Brunswick, l'incidence est plus élevée, soit 1 pour 17 000 naissances mâles (Arthus et al., 2000) et voir même jusqu'à 24 pour 1000 dans certains villages (Bichet et al., 1992), probablement de la même origine ancestrale puisque les gens affectés présentent la même mutation, soit W71X (aussi connu sous le nom de Hopewell) (Bichet et al., 1993; Holtzman et al., 1993). Dans plusieurs cas, les familles affectées présentent des mutations différentes et jusqu'à maintenant, plus de 170 mutations différentes responsables du diabète insipide néphrogénique ont été identifiées dans plus de 250 familles (Figure 13) (<http://www.medicine.mcgill.ca/nephros/>). Cependant, dix de ces mutations semblent être récurrentes (D85N, V88M, R113W, Y128S, R137H, S167L, R181C, R202C, A294P, et S315R) puisqu'elles sont présentes dans 35 familles d'origine indépendante (Arthus et al., 2000). La moitié de toutes les mutations répertoriées sont des mutations ponctuelles alors que 11% sont des mutations non-sens et finalement 39% des mutations sont des délétions ou insertions. Ces mutations sont réparties à travers tout le récepteur; cependant, il semble y avoir une concentration de mutations dans les domaines transmembranaires. Bien que la majorité des mutations entraînent une perte complète de la fonction des récepteurs, dans trois cas de mutations (D85N, G201D et P322S), le phénotype est partiel (Ala et al., 1998; Sadeghi et al., 1997; Vargas-Poussou et al., 1997).

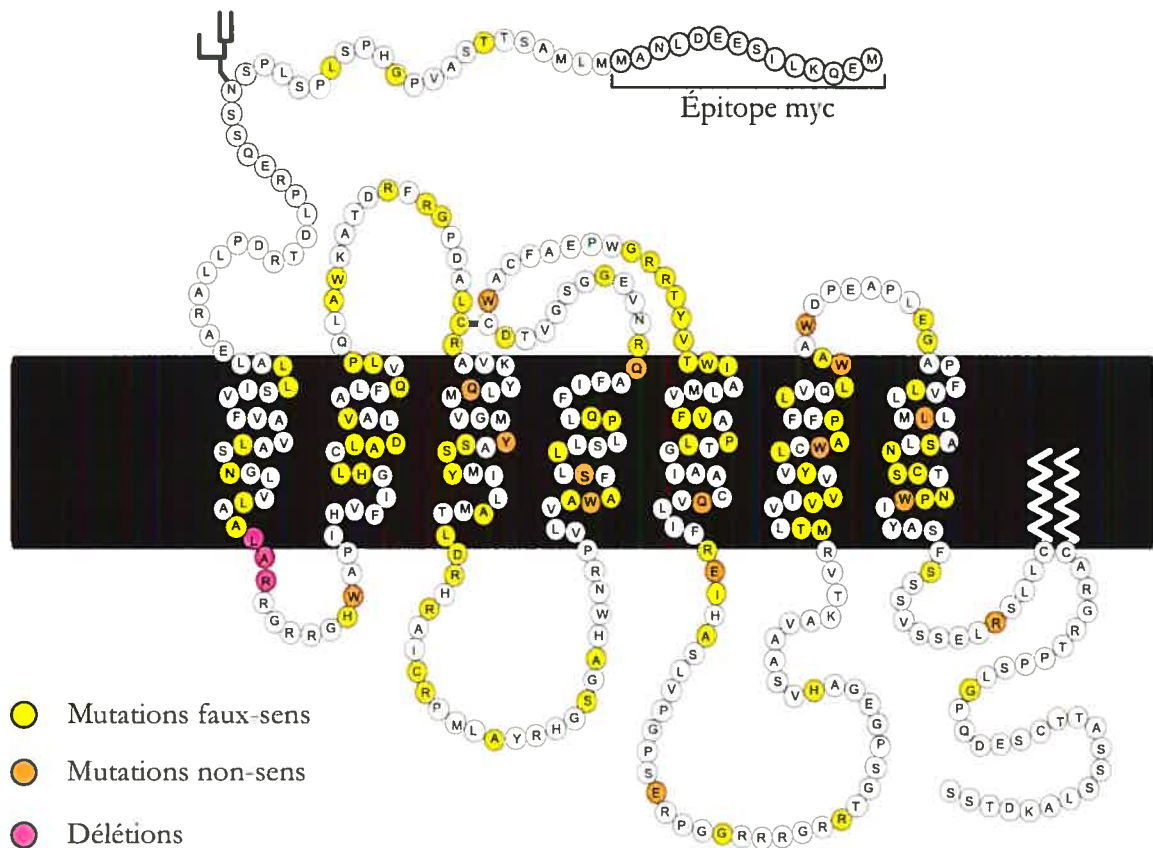


Figure 13 : Représentation schématique du récepteur V2 de la vasopressine

Plusieurs mutations responsables du diabète insipide néphrogénique sont indiquées selon leur type.

Toutes les mutations répertoriées entraînent différents effets fonctionnels au niveau du récepteur tel que démontré lorsqu'exprimé dans un système d'expression hétérologue. Environ 5% des mutations entraînent un problème au niveau de la cascade de signalisation, soit la liaison avec la protéine G, environ 25% affectent la liaison entre le récepteur et la vasopressine alors que plus de 70% de ces mutations entraînent un problème au niveau du repliement de la protéine (Ala et al., 1998). Ce mauvais repliement empêche le récepteur de passer le contrôle de qualité, ce qui entraîne une rétention à l'intérieur du réticulum

endoplasmique. En fait, 53 récepteurs mutants ont été caractérisés dans un système d'expression cellulaire et 38 d'entre-eux démontrent une rétention intracellulaire (Ala et al., 1998;Bernier et al., 2004;Birnbaumer et al., 1994;Morello et al., 2000;Oksche et al., 1996;Pan et al., 1994;Postina et al., 2000;Rosenthal et al., 1993;Schoneberg et al., 1996;Tsukaguchi et al., 1995a;Tsukaguchi et al., 1995b;Wenkert et al., 1996;Yokoyama et al., 1996). Cependant, le pourcentage de 25% est probablement surestimé et celui de 70% sous-estimé puisque dans certains cas, les récepteurs ont été classés comme ne pouvant lier la vasopressine alors que l'expression à la surface n'avait pas été vérifiée. Alors, certains de ces récepteurs font peut-être partie en réalité de la catégorie des récepteurs mal repliés. Une des mutations étudiées dans cette thèse est la mutation R137H. Cette mutation, contrairement aux autres mutations qui seront étudiées et qui présentent une rétention intracellulaire, entraîne une désensibilisation constitutive du récepteur (Barak et al., 2001). En effet, il a été démontré que ces récepteurs mutants sont constitutivement phosphorylés et interagissent avec la β -arrestine, ce qui entraîne la désensibilisation et l'internalisation du récepteur.

D'autre part, des souris transgéniques avec une mutation dans le récepteur V2 (G242X) ont été produites (Yun et al., 2000). Les mâles transgéniques démontrent une incapacité à concentrer l'urine et meurent pendant la première semaine après leur naissance due à une trop grande déshydratation. Tandis que les femelles hétérozygotes démontrent une croissance normale mais avec une capacité réduite à concentrer l'urine. Ces résultats confirment donc l'implication des mutations au niveau du gène du récepteur V2 de la vasopressine dans le phénotype de diabète insipide néphrogénique.

2.2.1 Mutations de l'aquaporine-2

Environ 10% des patients atteints du diabète insipide néphrogénique présentent des mutations dans le gène de l'aquaporine-2. Ces patients, autant des hommes que des femmes, peuvent être atteints puisque le gène de l'aquaporine-2 est sur le chromosome 12 (12q13) (Sasaki et al., 1994). Le groupe de Deen a identifié les premières mutations dans le gène de l'aquaporine-2 responsables du diabète insipide néphrogénique (Deen et al., 1994) et à ce jour, plus de 25 mutations dans ce gène ont été identifiées dans 25 familles (Morello and Bichet, 2001). Environ 65% sont des mutations ponctuelles alors que 8% sont des mutations non-sense et finalement 27% sont des délétions ou insertions (<http://www.medicine.mcgill.ca/nephros/>). Certaines mutations sont dominantes et généralement localisées dans l'extrémité C-terminal. Tandis que les mutations récessives sont réparties partout dans le gène (van Os and Deen, 1998). Comme dans le cas des récepteurs V2, les aquaporines-2 mutantes sont souvent retenues dans le réticulum endoplasmique probablement dû à un mauvais repliement de la protéine (Deen et al., 1995; Mulders et al., 1997; Tamarappoo and Verkman, 1998).

Des souris exprimant l'aquaporine-2 portant la mutation T126M ont été générées et elles sont sévèrement atteintes de diabète insipide néphrogénique (Yang et al., 2001). En fait, ces souris meurent au 6^e jour après leur naissance dû à des problèmes de concentration de l'urine. Il est possible qu'elles survivent plus de six jours si elles sont traitées avec une plus grande quantité de fluides. Toutefois, l'administration d'un agoniste des récepteurs de la vasopressine n'a aucun effet. Un phénotype aussi sévère supporte le rôle critique de l'aquaporine-2 dans la fonction rénale chez les souris comparativement aux aquaporines-1, 3

et 4 où des effets furent remarqués dans la concentration de l'urine sans toutefois entraîner la mort (Ma et al., 1997;Ma et al., 1998;Ma et al., 2000). Ces résultats confirment l'importance de l'aquaporine-2 dans le phénotype de diabète insipide néphrogénique.

Chapitre 3

Récepteurs couplés aux protéines G

Le récepteur V2 de la vasopressine, la protéine faisant l'objet de cette thèse, est un récepteur couplé aux protéines G. Alors, la prochaine section traitera les généralités de cette grande famille de récepteurs.

Les récepteurs couplés aux protéines G représentent la plus grande famille de récepteurs et environ 2% des protéines potentiellement codées par le génome humain récemment séquencé (Venter et al., 2001). Ces récepteurs sont impliqués dans la régulation de différents processus physiologiques, dont la neurotransmission, le métabolisme, la sécrétion, la différenciation, l'immunité et la croissance, en réponse à des stimuli, tels des ions, des amines, des peptides et même de grandes protéines (Devi, 2000). La liaison du ligand spécifique au récepteur entraîne un changement de conformation qui conduit à l'activation d'une protéine G trimérique (Figure 14). Cette protéine G va ensuite moduler divers effecteurs, tels l'adénylate cyclase, la PLC (phospholipase C), la PLA (phospholipase A), afin de mener par exemple à une modulation de la production d'AMP cyclique ou une élévation de calcium dans le cytosol, qui provoquera une réponse cellulaire.

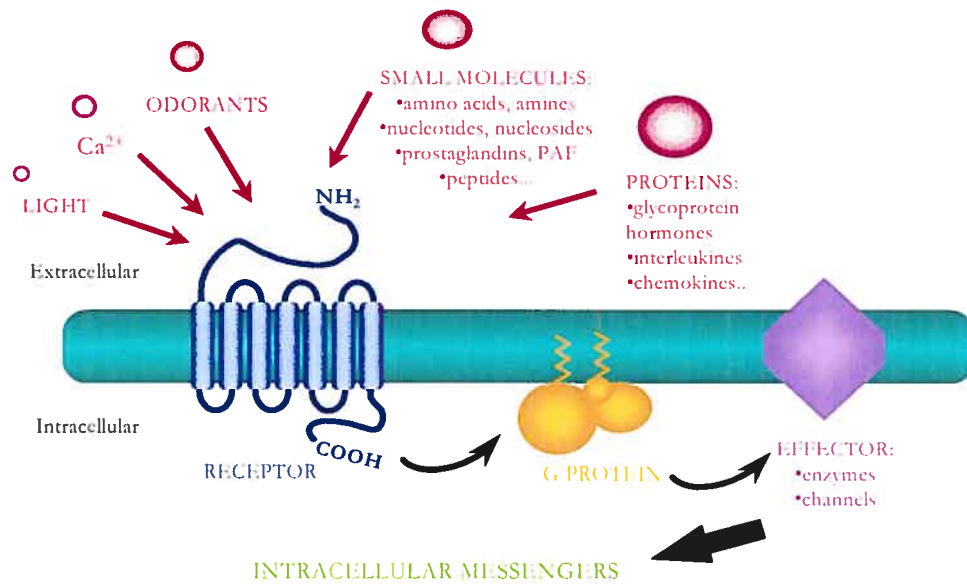


Figure 14 : Représentation schématique d'un récepteur couplé aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G peuvent être activés par différents stimuli, tels la lumière, le calcium, des odorants, de petites molécules ainsi que de grandes protéines, qui provoquent un changement de conformation du récepteur. Ce changement de conformation permettra l'activation de la protéine G, qui modulera différents effecteurs afin de permettre une réponse cellulaire.

3.1 Topologie

La topologie des récepteurs couplés aux protéines G consiste en un corps hydrophobe de sept passages transmembranaires formés d'hélices α de grandeurs variables avec une extrémité N-terminal extracellulaire et une extrémité C-terminal intracellulaire. Il existe une multitude de liens hydrogène nécessaires à maintenir toute la structure compacte en forme de baril perpendiculaire à la membrane avec les passages transmembranaires dans le sens anti-horaire. Les domaines transmembranaires sont constitués d'environ 20 à 25 acides

aminés majoritairement hydrophobes. Cependant, les domaines transmembranaires 2, 3, 5 et 6 sont moins hydrophobes que les autres (1, 4 et 7) dus à la présence de quelques résidus neutres ou ioniques. Les boucles intracellulaires et extracellulaires, quant à elles, sont constituées d'environ 10 à 40 acides aminés majoritairement hydrophiles sauf pour la 3^e boucle intracellulaire qui peut atteindre jusqu'à 150 acides aminés. La structure des domaines extracellulaires est très organisée et compacte, comprenant un pont disulfure très conservé chez certains de ces récepteurs. Des sites pour la N-glycosylation se trouvent à l'extrémité N-terminal tandis que des sites de palmitoylation se trouvent à l'extrémité C-terminal afin de réguler le transport du récepteur. Des sites pour la phosphorylation sont aussi présents dans l'extrémité C-terminal et dans la 3^e boucle intracellulaire afin de réguler la transduction du signal.

Récemment, la première structure cristalline d'un récepteur couplé aux protéines G, celle de la rhodopsine, fut déterminée par cristallographie aux rayons X (Figure 15) (Palczewski et al., 2000). Comme prévu et présenté à la figure 15, la structure présente les sept passages transmembranaires en hélices α liés ensemble dans le sens anti-horaire par trois boucles intracellulaires et trois boucles extracellulaires. De plus, il semble y avoir une 8^e hélice alpha, presque parallèle à la membrane, qui serait importante pour l'interaction entre la rhodopsine et la protéine G. Les boucles extracellulaires se replient autour de deux boucles en épingle β afin de former un domaine très compact pour le contact avec le chromophore.

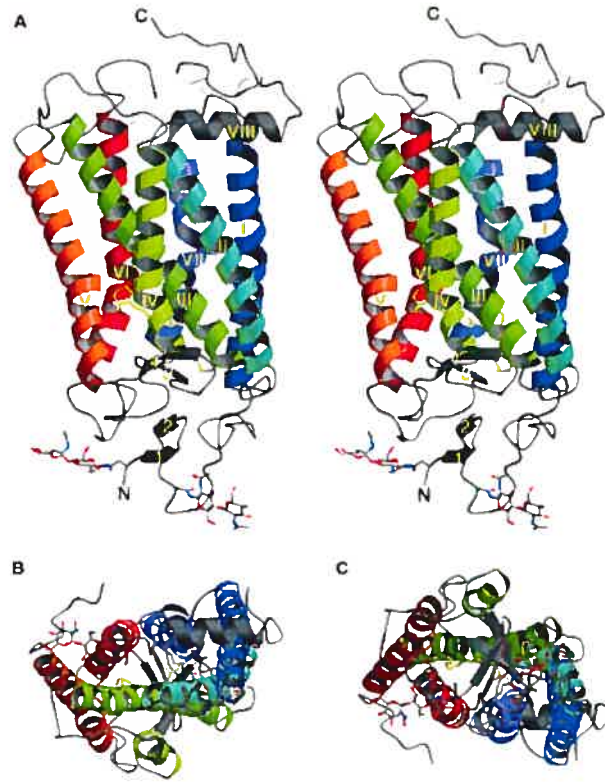


Figure 15 : Structure tridimensionnelle de la rhodopsine

Les sept passages transmembranaires en hélices α dans le sens anti-horaire sont reliés entre eux par les boucles intracellulaires et extracellulaires et une 8^e hélice α est aussi présente dans l'extrémité C-terminal. **A.** vue parallèle au plan de la membrane **B.** vue du côté cytoplasmique **C.** vue du côté extracellulaire (Palczewski et al., 2000).

Compte tenu de leur structure, les récepteurs couplés aux protéines G ont été classés en trois grandes familles (Figure 16) (Probst et al., 1992; Strader et al., 1995; Ulloa-Aguirre et al., 1999). Tout d'abord, la première famille, dont la rhodopsine et les récepteurs adrénergiques sont des membres prototypiques, est la famille la plus étudiée. La majorité des récepteurs couplés aux protéines G, dont le récepteur V2 de la vasopressine, font partie de cette famille. Ces récepteurs peuvent être activés par une multitude de stimuli incluant les photons, les odeurs, des hormones et des neurotransmetteurs. Étant donné la grande

diversité de ligands, la longueur de l'extrémité N-terminal présente une grande variabilité. Cette famille partage plusieurs caractéristiques structurales. Dans la 1^{ère} et 2^e boucles extracellulaires, deux cystéines sont très conservées, permettant la formation d'un pont disulfure qui est responsable de la stabilité de la protéine. Suite au 3^e passage transmembranaire, un triplet d'acides aminés très conservé (DRY) semble être impliqué dans l'interaction avec la protéine G. De plus, dans l'extrémité C-terminal, il y a un site de palmytation très conservé. D'autre part, deux autres résidus, l'acide aspartique dans le 2^e passage transmembranaire et l'asparagine dans le 7^e passage transmembranaire, sont très conservés. Ces deux résidus semblent être essentiels pour garder les passages transmembranaires 2 et 7 près l'un de l'autre afin de permettre le changement de conformation lors de l'activation du récepteur qui est nécessaire à l'activation de la protéine G.

Ensuite, la deuxième famille, dont les récepteurs de la sécrétine et VIP (vasointestinal peptide), lie plusieurs neuropeptides et hormones avec l'extrémité N-terminal. Cette famille conserve le pont disulfure entre la 1^{ère} et 2^e boucles extracellulaires de la famille 1 et possède une très longue extrémité N-terminal contenant au moins six cystéines très conservées qui sont impliquées dans la liaison du ligand.

Finalement, la troisième famille, comprenant les récepteurs métabotropiques du glutamate, lie le glutamate, le plus important neurotransmetteur excitateur dans le système nerveux central. Les récepteurs de cette famille possèdent eux aussi une très longue extrémité N-terminal en forme de « Venus flytrap » pour la liaison du ligand mais une extrémité C-terminal très variable.

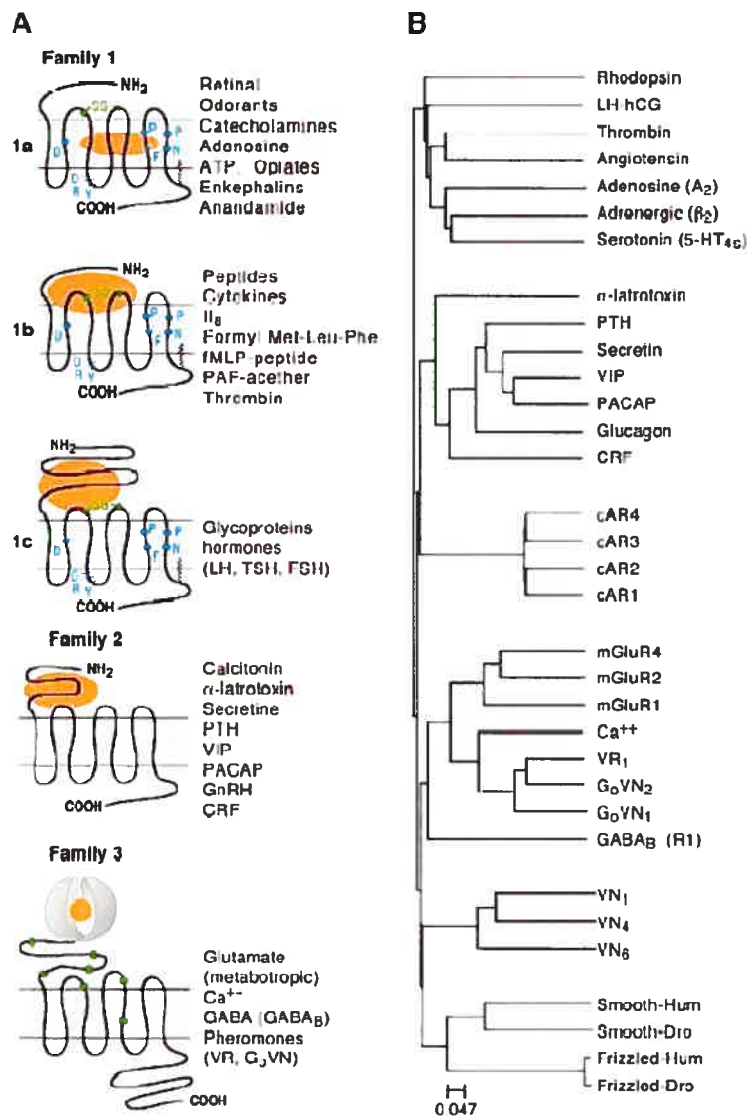


Figure 16 : Familles de récepteurs couplés aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G ont été classés en trois grandes familles selon la similitude de leur structure (Probst et al., 1992).

Plusieurs études biochimiques démontrent bien que les récepteurs couplés aux protéines G existent sous forme homodimérique ou hétérodimérique (Angers et al., 2002; Salahpour et al., 2000; Terrillon and Bouvier, 2004). De plus, il fut démontré par des expériences de microscopie de force atomique que la rhodopsin serait sous forme dimérique

dans son arrangement naturel dans la membrane (Fotiadis et al., 2003). La dimérisation, qui se produit très tôt après la biosynthèse, semble importante à plusieurs étapes de la vie de certains récepteurs couplés aux protéines G, telles l'ontogénie, la liaison du ligand, la diversité pharmacologique, la transduction du signal et l'internalisation (Figure 17) (Terrillon and Bouvier, 2004).

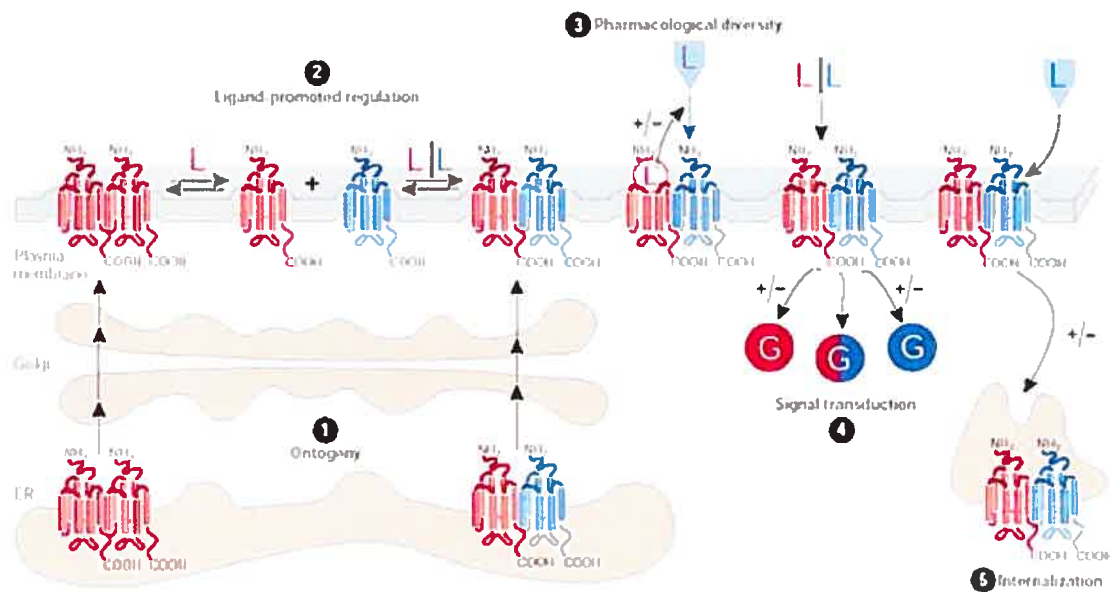


Figure 17 : Rôle de la dimérisation dans la vie d'un récepteur couplé aux protéines G

La dimérisation semble être importante à différentes étapes de la vie de certains récepteurs couplés aux protéines G, tels l'ontogénie (1), la liaison du ligand (2), la diversité pharmacologique (3), la transduction du signal (4) et l'internalisation (5) (Terrillon and Bouvier, 2004).

3.2 Activation

Les récepteurs couplés aux protéines G semblent exister sous plusieurs formes variant entre la forme complètement inactive R et la forme complètement active R* (Figure

18) (Kenakin, 1996;Leff, 1995;Lefkowitz et al., 1993;Seifert and Wenzel-Seifert, 2002). Tel que démontré à la figure 18, les ligands permettent une modulation entre les différentes formes (Seifert and Wenzel-Seifert, 2002). Les agonistes complets permettent d'induire la forme R^* alors que les agonistes partiels ne favorisent pas complètement cette forme R^* . Les agonistes inverses complets, quant à eux, vont fortement stabiliser la forme R tandis qu'un agoniste inverse partiel est moins efficace à stabiliser la forme R . Les antagonistes neutres n'affectent pas l'état d'activation mais ils empêchent seulement la liaison d'un autre ligand.

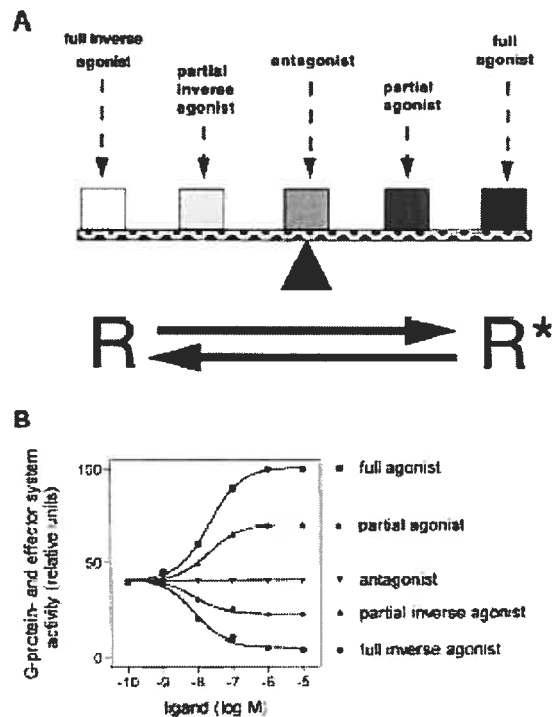


Figure 18 : Différents états d'activation en fonction du type de ligand (Kenakin, 1996).

Plusieurs formes du récepteur existent entre la forme R et R^* et la nature du ligand (agoniste, antagoniste ou agoniste inverse / partiel ou complet) qui lie le récepteur va changer l'équilibre. Selon la forme du récepteur favorisée, l'effet sur les effecteurs sera différente tel que démontré en B.

Deux hypothèses ont été suggérées afin d'expliquer le changement d'équilibre. La première hypothèse suggérée est que la liaison du ligand change la conformation du récepteur, en R^* par exemple dans le cas d'un agoniste. La deuxième hypothèse proposée est que la liaison du ligand stabilise la forme qu'il lie. Il est aussi très probable que ce soit une contribution des deux hypothèses. L'isomérisation R en R^* d'un récepteur peut aussi se produire spontanément, soit en l'absence du ligand, entraînant une petite activité constitutive à différents niveaux selon le récepteur. Des mutations peuvent aussi entraîner une activité constitutive du récepteur, alors le récepteur est considéré comme constitutivement actif et peut entraîner certaines pathologies (Parnot et al., 2002; Seifert and Wenzel-Seifert, 2002).

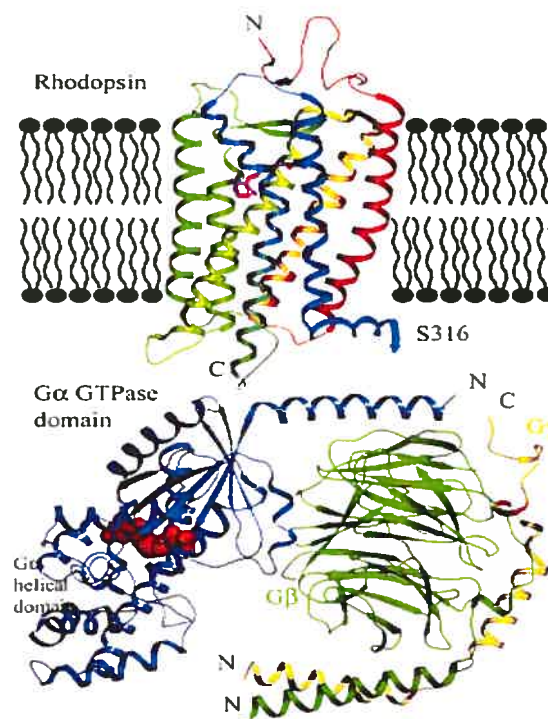


Figure 19 : Structure tridimensionnelle de la protéine G sous la rhodopsine (Hamm, 2001).

Structure tridimensionnelle des trois sous-unités de la protéine G et leur position par rapport au récepteur selon les prédictions basées sur leur séquence.

Lors de l'activation des récepteurs par l'agoniste, la forme R^* est donc favorisée par un changement de conformation du récepteur, soit la rotation du 3^e domaine transmembranaire par rapport au 6^e domaine transmembranaire (Bockaert and Pin, 1999; Gether et al., 1997b; Seifert and Wenzel-Seifert, 2002; Sheikh et al., 1999). Les boucles intracellulaires permettent la formation du domaine de liaison pour la protéine G tel qu'illustré à la figure 19 (Hamm, 2001; Schoneberg et al., 1999; Strange, 1999; Wess, 1997).

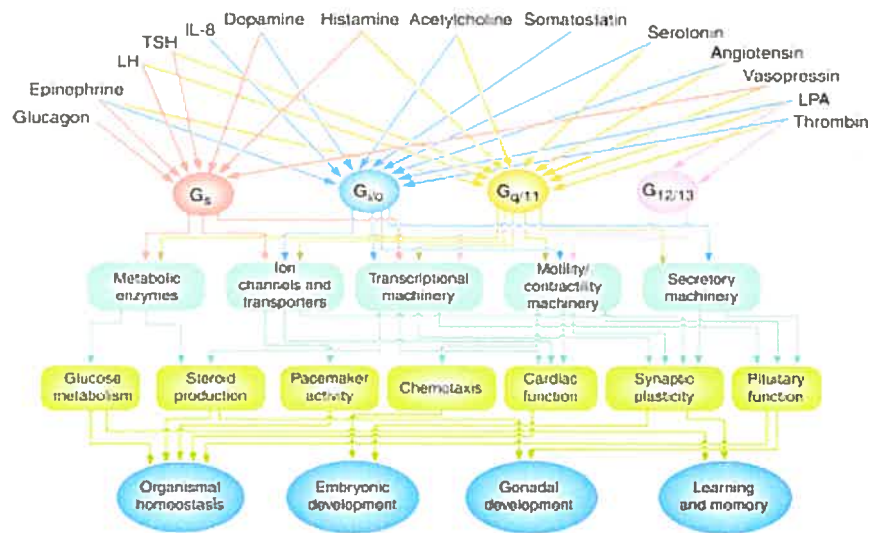


Figure 20 : Diversité des voies d'activation des protéines G (Neves et al., 2002).

Les protéines G sont des GTPases hétérotrimériques, comprenant une sous-unité α , une β et une γ ; il existe 21 sous-unités α , 5 sous-unités β et 12 sous-unités γ . Les familles de protéines G sont divisées en fonction de la nature de la sous-unité α , soit la famille $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$ et $G\alpha_{12/13}$. Elles modulent différents effecteurs, qui seront discutés à la fin de cette section, entraînant une grande diversité de signaux tel que démontré à la figure 20 (Neves et al., 2002). Les sous-unités $G\beta\gamma$, qui sont très fortement liées entre elles par des liens hydrophobes, peuvent aussi moduler des effecteurs (Ulloa-Aguirre et al., 1999).

Suite à l'activation du récepteur par le ligand, la forme R^* permet l'accès de la protéine G aux 2^e et 3^e boucles cytoplasmiques ainsi que la queue C-terminal. Cette liaison activera la protéine G en causant le relâchement du GDP de la sous-unités $G\alpha$ (Ernst et al., 2000; Franke et al., 1990; Marin et al., 2000). Alors le GTP liera la protéine $G\alpha$ et comme il a été proposé que le complexe $G\alpha$ -GTP ait une affinité moindre pour les sous-unités $G\beta\gamma$ et le récepteur, il y aurait dissociation des sous-unités α et $\beta\gamma$. Les différentes sous-unités de la protéine G pourront à leur tour activer différents effecteurs (Hamm, 2001). Il semble que les sous-unités $\beta\gamma$ aussi interagissent directement avec le récepteur, probablement avec la queue C-terminal (Ernst et al., 2000; Kisselev et al., 1994; Marin et al., 2000; Taylor et al., 1996; Yasuda et al., 1996).

Les protéines G activées par un récepteur donné moduleront différents effecteurs (Figure 21) (Ulloa-Aguirre et al., 1999). Dans le cas des protéines $G\alpha_s$, la voie de l'adénylate cyclase est stimulée et permet la transformation de l'ATP en AMP cyclique. Par la suite, cet AMP cyclique permet l'activation de la PKA qui est une kinase impliquée dans diverses réponses cellulaires. Dans le cas des protéines $G\alpha_i$, cette cascade de signalisation est inhibée. D'autre part, l'activation des protéines $G\alpha_q$ stimule la PLC, permettant la transformation de PIP2 (phosphoinositol 4,5-bisphosphate) en DAG (diacylglycerol) et IP3 (inositol 1,4,5-trisphosphate). Par la suite, ces effecteurs permettent l'augmentation du taux de calcium dans le cytosol et l'activation de la PKC (protéine kinase C). Les protéines $G\alpha_{12/13}$, pour leur part, activent de la PLA_2 . Les sous-unités $\beta\gamma$ permettent aussi l'activation de certains effecteurs, tels la PLA , la PLC, l'adénylate cyclase, les canaux ioniques, les GRK et la kinase c-Src (Jan and Jan, 1997; Schneider et al., 1997; Ulloa-Aguirre et al., 1999).

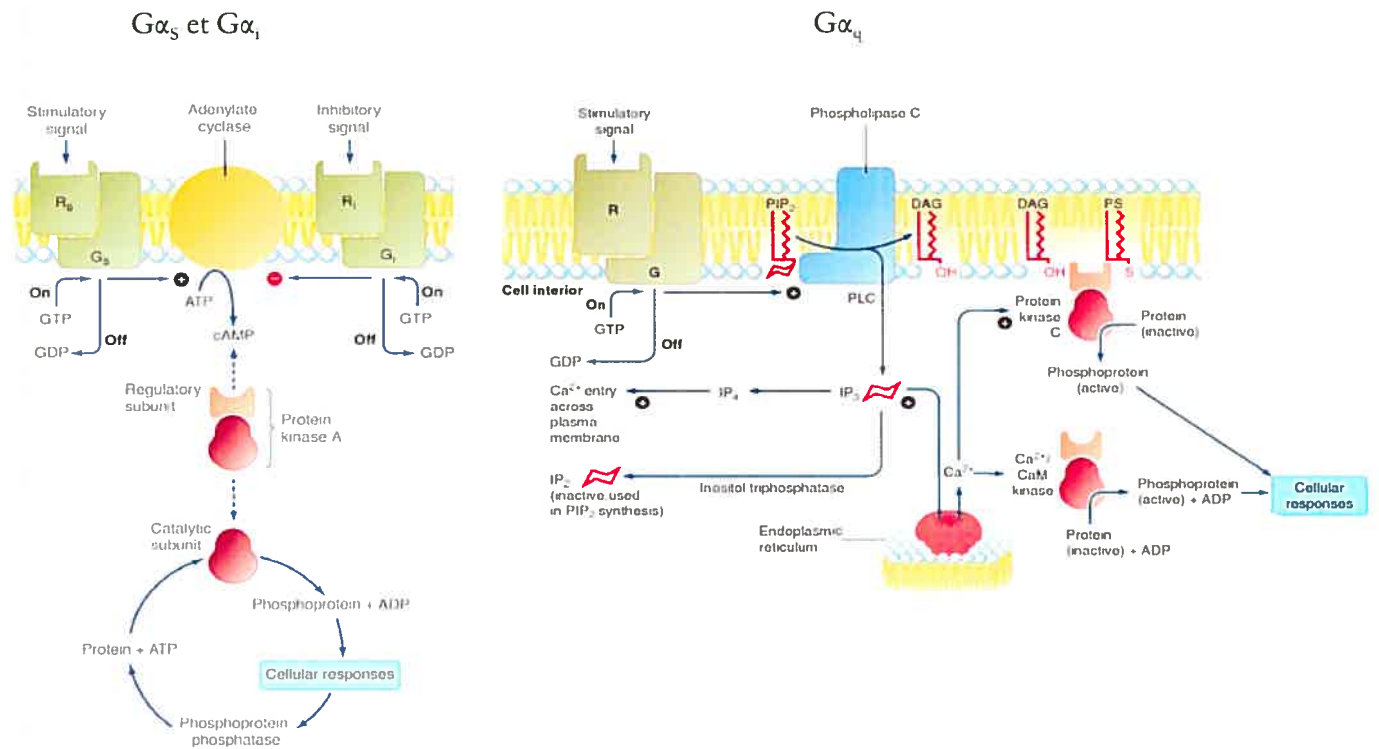


Figure 21 : Voies de signalisation suite à l'activation des protéines Gα_s, Gα_i ou Gα_q

Les protéines Gα_s activent l'adénylate cyclase permettant une production d'AMP cyclique et l'activation de la PKA tandis que les protéines Gα_i inhibent cette voie. Les protéines Gα_q stimulent la PLC permettant la transformation de PIP₂ en DAG et IP₃ afin de permettre l'augmentation du taux de calcium et l'activation de la PKC (Ulloa-Aguirre et al., 1999).

3.2.1 MAPK

Divers agents mitogéniques, tels la thrombine, la LPA (lysophosphatidic acid), la bombésine, la vasopressine, la bradykinine, la substance K, l'acétylcholine, l'angiotensine II et bien d'autres, permettent l'activation des MAPK en liant leur récepteur respectif (Gutkind, 1998). En effet, plusieurs voies distinctes d'activation des MAPK (mitogen-activated protein

kinase) en réponse aux récepteurs couplés aux protéines G ont été démontrées (Figure 22) (Marinissen and Gutkind, 2001).

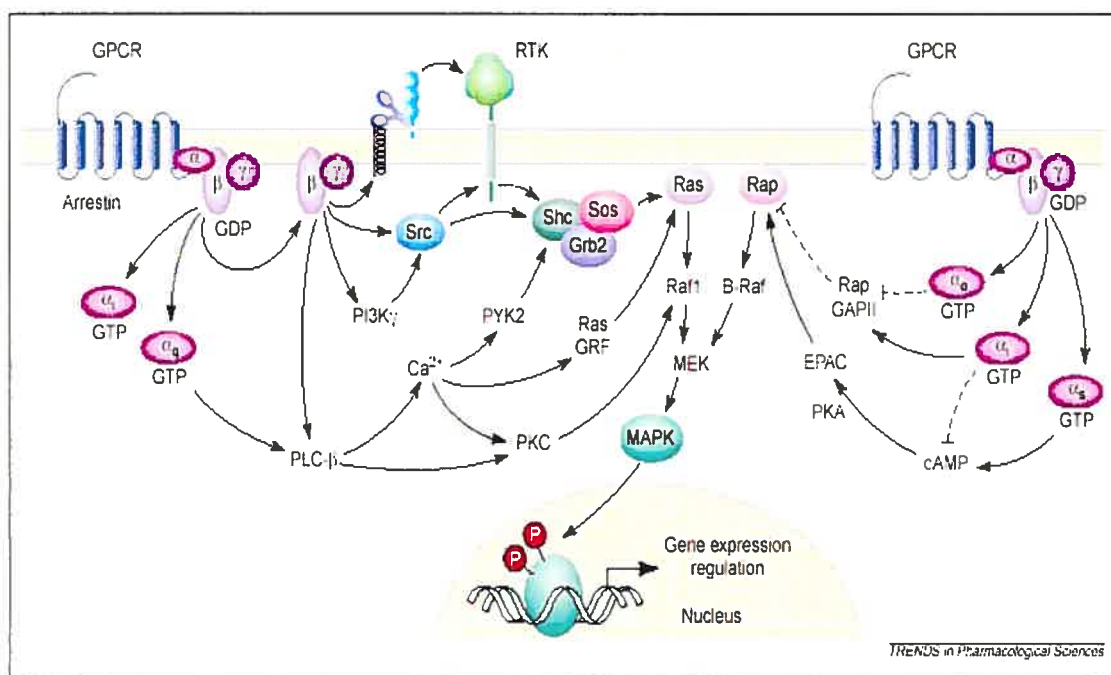


Figure 22 : Activation des MAPK par les récepteurs couplés aux protéines G

Différentes voies d'activation des MAPK suite à l'activation des effecteurs classiques des protéines G, tels la PLC, l'adénylate cyclase ou la PI3K, ainsi que suite à une transactivation des récepteurs tyrosine kinase (Marinissen and Gutkind, 2001).

L'activation des MAPK est très hétérogène entre les différents récepteurs et les différentes lignées cellulaires et même à l'intérieur d'une même lignée cellulaire pour un même récepteur, différentes voies peuvent être utilisées (Wetzker and Bohmer, 2003). Ces différentes voies peuvent être classées en trois catégories : suite à l'activation des effecteurs classiques des protéines G, suite à une interaction avec la β -arrestine et suite à une transactivation avec les récepteurs tyrosine kinase.

3.2.1.1 Effecteurs classiques des protéines G

Les MAPK peuvent être activées suite à l'activation des protéines G par les kinases dépendantes des seconds messagers, tels la PKA, la PKC, et par le calcium intracellulaire (Figure 23) (Wetzker and Bohmer, 2003). Ces kinases et le calcium vont généralement agir à différents endroits dans la cascade classique menant à l'activation des ERK, soit $c\text{-Src} \rightarrow \text{Shc/Gbr2/Sos1} \rightarrow \text{Ras} \rightarrow \text{Raf-1 ou B-Raf} \rightarrow \text{MEKs} \rightarrow \text{ERKs}$. c-Src est un intermédiaire dans plusieurs voies d'activation des ERKs (extracellular signal-regulated kinase) dépendantes (Daaka et al., 1997) ou non (Seta et al., 2002) de la protéine G.

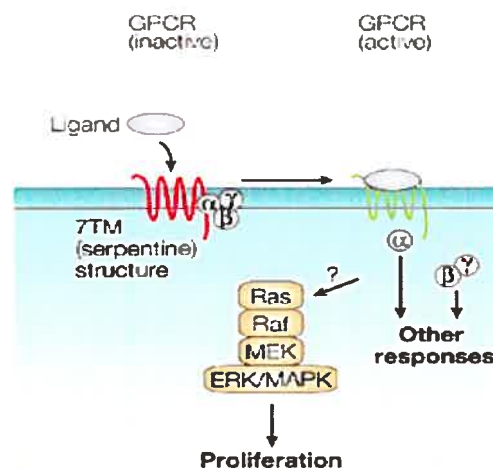


Figure 23 : Activation des MAPK directement par un récepteur couplé aux protéines G (Wetzker and Bohmer, 2003).

Les kinases dépendantes des seconds messagers, tels la PKA, la PKC, et le calcium intracellulaire peuvent activer directement la cascade des MAPK à différentes étapes.

3.2.1.2 β -arrestine

La β -arrestine fut longtemps perçue comme étant uniquement une protéine permettant la terminaison du signal des récepteurs couplés aux protéines G suite à leur activation. En effet, lors de la liaison de la β -arrestine au récepteur, il y a découplage du récepteur avec la protéine G empêchant celui-ci de signaler à nouveau, phénomène connu sous le terme désensibilisation (qui sera décrit plus en détail à la section 3.3). Une des premières évidences que la β -arrestine pourrait être impliquée dans la signalisation cellulaire provient d'études démontrant que le recrutement de c-Src par la β -arrestine mène à l'activation de la cascade ERK. Maintenant, la β -arrestine est perçue comme une protéine d'échafaudage permettant la bonne localisation, la spécificité et la proximité des différentes composantes d'une cascade menant à l'activation des MAPK (Figure 24) (Defea et al., 2000b; Luttrell et al., 2001; Luttrell and Lefkowitz, 2002; McDonald et al., 2000; Shenoy and Lefkowitz, 2003a; Tohgo et al., 2002; Tohgo et al., 2003).

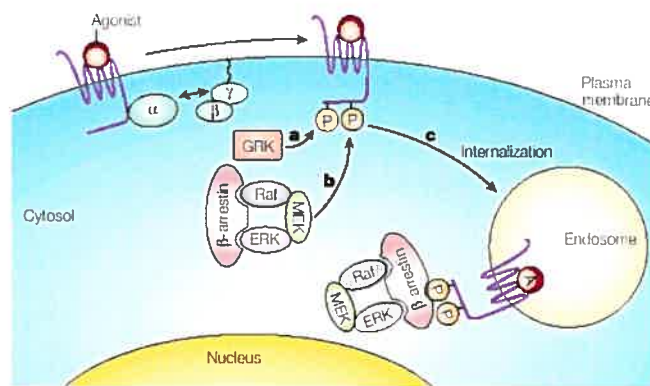


Figure 24 : Activation des MAPK par la β -arrestine

La β -arrestine agit comme protéine d'échafaudage permettant le rassemblement des différentes composantes nécessaires à l'activation des MAPK (Luttrell et al., 2001).

3.2.1.3 Transactivation par les récepteurs tyrosine kinase

Plusieurs évidences proposent que certaines voies de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G pour activer les ERK convergent avec celles des récepteurs tyrosine kinase (Figure 25) (Wetzker and Bohmer, 2003). En effet, ces deux voies nécessitent la phosphorylation des tyrosines de Shc et l'activation de la GTPase Ras, soit par phosphorylation des complexes en aval des récepteurs tyrosine kinase ou en phosphorylant directement ces récepteurs, tels le récepteur de l'EGF (epidermal growth factor) ou du PDGF (platelet-derived growth factor). Ce phénomène est maintenant connu en tant que la transactivation des récepteurs tyrosine kinase par les récepteurs couplés aux protéines G. Cependant, il existe plusieurs voies possibles de cette transactivation.

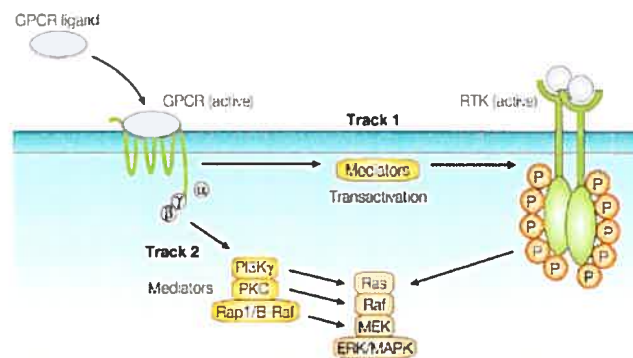


Figure 25 : Activation des MAPK par les récepteurs couplés aux protéines G

La première voie démontre la transactivation du récepteur tyrosine kinase suite à l'activation du récepteur couplé aux protéines G alors que la deuxième voie démontre l'activation des MAPK directement par des kinases activées par la stimulation des protéines G (Wetzker and Bohmer, 2003).

Dans certains cas, la transactivation est médiée par les sous-unités $\beta\gamma$ de la protéine G ou la β -arrestine (Figure 26) (Crespo et al., 1994; Gutkind, 1998; Lopez-Illasaca et al., 1997; Luttrell et al., 1997; Luttrell et al., 1999; Maudsley et al., 2000). Il fut même démontré que les récepteurs couplés aux protéines G peuvent former un complexe avec les récepteurs tyrosine kinase et les composantes de la cascade menant à l'activation des ERK (Luttrell et al., 1997). Effectivement, les récepteurs β_2 -adrénergiques peuvent former un complexe avec le récepteur de l'EGF (Maudsley et al., 2000) alors que les récepteurs de la LPA peuvent former un complexe avec le PDGF β R (Herrlich et al., 1998).

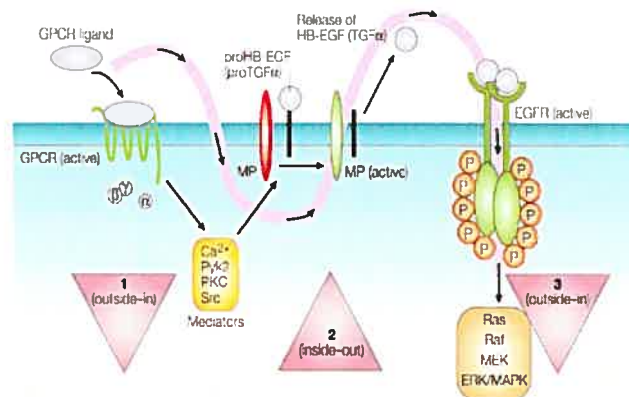


Figure 26 : Activation des MAPK par les récepteurs couplés aux protéines G

La stimulation du récepteur couplé aux protéines G entraîne l'activation d'une métalloprotéinase qui clivera le ligand du récepteur tyrosine kinase afin que ce ligand puisse activer son récepteur (Wetzker and Bohmer, 2003).

Certains ligands des récepteurs tyrosine kinase sont déjà à proximité du récepteur en tant que pro-ligands transmembranaires et suite à une coupure par une métalloprotéinase (probablement de la famille ADAM (Schlondorff and Blobel, 1999)), le ligand actif est relâché et peut activer son récepteur. Parfois, les récepteurs couplés aux protéines G peuvent amener au relâchement d'un ligand en activant une métalloprotéinase (Pierce et al.,

2001;Prenzel et al., 1999). Effectivement, les récepteurs de la thrombine, de la bombésine, de l'endothéline et de la LPA permettent le relâchement d'un ligand du récepteur de l'EGF, HB-EGF (heparine binding EGF) (Prenzel et al., 1999).

3.3 Désensibilisation

La stimulation prolongée et continue d'un récepteur par un agoniste entraîne la désensibilisation de ce récepteur afin de protéger la cellule contre une stimulation excessive. La désensibilisation se produit très rapidement, dans les secondes ou minutes après l'exposition à l'agoniste, et implique la phosphorylation du récepteur dans les boucles intracellulaires et l'extrémité C-terminal par des kinases GRK ou des kinases activées par des seconds messagers, tels la PKA et la PKC. La liaison de l'agoniste et la phosphorylation du récepteur provoquent le recrutement d'une protéine soluble, l'arrestine, qui entraîne le découplage du récepteur et de la protéine G.

3.3.1 Kinases activées par des seconds messagers

La production de seconds messagers par un récepteur stimulé entraîne l'activation de protéines kinases, tels la PKA et la PKC, qui permettent la phosphorylation de sérines et thréonines dans l'extrémité C-terminal et dans la 3^e boucle intracellulaire. La phosphorylation de ces sites est suffisante pour désensibiliser le récepteur (Benovic et al., 1985). Ce processus peut se produire par l'activation d'un autre récepteur, dans ce cas, la

désensibilisation est hétérologue (Lefkowitz, 1993). De plus, la β -arrestine n'est pas nécessaire pour ce processus.

3.3.2 GRK

Il existe sept gènes pour les GRK (Premont et al., 1995; Sterne-Marr and Benovic, 1995). Les GRK1 (rhodopsine kinase) et GRK7 sont des kinases rétinales (Weiss et al., 1998) alors que les GRK2-6 sont plus largement distribuées. Le ciblage des GRK à la membrane est très critique pour leur fonction et relève de l'extrémité C-terminal (Stoffel, III et al., 1997). Les GRK1 et GRK7 possèdent un motif CAAX permettant leur farnésylation tandis que les GRK4 et GRK6 sont palmitylées et elles sont toutes constitutivement à la membrane. Les GRK2 et GRK3 quant à elles possèdent un site de liaison pour les sous-unités $\beta\gamma$ de la protéine G qui permet un recrutement dynamique à la membrane (Kozasa, 2004). Le ciblage de GRK5 semble impliquer des interactions électrostatiques entre un domaine très basique de 46 résidus avec les phospholipides de la membrane.

Les GRK permettent la phosphorylation de sérines et thréonines situées dans la 3^e boucle intracellulaire ou l'extrémité C-terminal du récepteur activé par son ligand. Cette phosphorylation du récepteur par les GRK n'est pas suffisante pour la désensibilisation mais permet de recruter avec une haute affinité la β -arrestine, qui elle, entraîne la désensibilisation (Bouvier et al., 1988; Ferguson et al., 1995; Gurevich et al., 1995; Hausdorff et al., 1989; Lohse et al., 1990).

3.3.3 Arrestine

Il existe quatre arrestines mammifères, dont deux sont spécifiques à la voie de la phototransduction et ne font pas l'objet de cette thèse, l'arrestine-1 et -4, et les deux autres sont ubiquitaires, soit l'arrestine-2 (β -arrestine-1) et l'arrestine-3 (β -arrestine-2) (Sterne-Marr and Benovic, 1995). La structure cristalline de l'arrestine visuelle révéla que les arrestines possèdent deux grands domaines, le domaine N (résidus 1-180) et le domaine C (résidus 188-362) (Figure 27) (Granzin et al., 1998; Gurevich and Gurevich, 2004). Dans la région de liaison entre les deux domaines, il y a le centre polaire qui permet la détection des phosphates sur le récepteur. À l'état basal, le domaine C de l'arrestine interagit avec le centre polaire afin de maintenir l'arrestine inactive. La liaison du récepteur phosphorylé avec ce centre polaire entraîne la perturbation de l'interaction avec le domaine C et permet à l'arrestine de lier le récepteur avec une haute affinité.

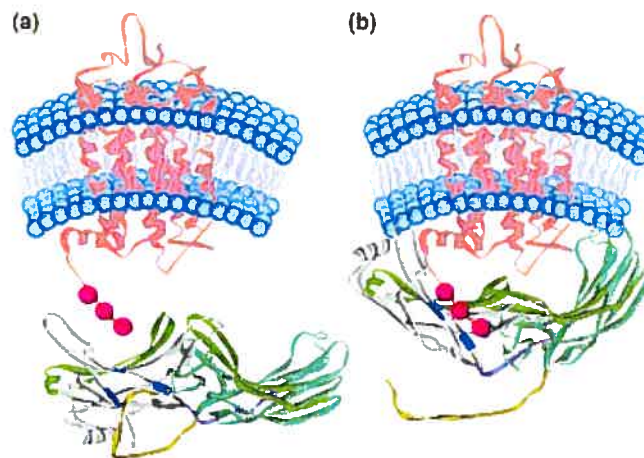


Figure 27 : Activation de l'arrestine provoquant l'ouverture des domaines N et C

La β -arrestine à l'état basal est inactive et le domaine C (jaune) est refermé sur le centre polaire (bleu foncé) (a). La β -arrestine en liaison avec le récepteur va permettre l'ouverture du domaine C (b) (Gurevich and Gurevich, 2004).

À l'état basal, la β -arrestine est cytosolique. Lors de l'activation du récepteur par le ligand et la phosphorylation du récepteur par les GRK, elle est recrutée au récepteur (Barak et al., 1997; Oakley et al., 1999; Oakley et al., 2000). Une fois à la membrane, la β -arrestine amènera le récepteur à un puit de clathrine (Scott et al., 2002) en liant directement la clathrine (Goodman et al., 1996). Les résidues 371-379 de la β -arrestine-2, les plus critiques étant les résidues hydrophobes L373, I374 et F376 et les résidues acides E375 et E377 (Krupnick et al., 1997a), lie la région comprenant les résidues 89-100 de la clathrine, les plus critiques étant les résidues E89, K96 et K98 (Goodman, Jr. et al., 1997). L'inhibition de l'interaction de la β -arrestine avec la clathrine empêche l'internalisation (Krupnick et al., 1997b). La β -arrestine lie aussi une protéine adaptatrice de la clathrine, AP-2 (adaptor protein-2) (Laporte et al., 1999). La protéine AP-2 lie les résidues R394 et R396 de la β -arrestine-2 dans la région carboxy terminal après le site de liaison pour la clathrine et cette interaction est indépendante de la liaison β -arrestine/clathrine (Laporte et al., 2000). La β -arrestine lie d'abord la protéine AP-2 afin de permettre le ciblage aux puits de clathrines (Claing et al., 2002) qui sont déjà formés (Scott et al., 2002) (Figure 28).

Les β -arrestine-1 et β -arrestine-2 sont homologues et sont identiques à 78% (Attramadal et al., 1992). Cependant, leurs affinités pour chaque récepteur varient, ce qui a permis de classer les récepteurs en deux classes (Oakley et al., 2000; Zhang et al., 1999). Les récepteurs de la classe A, incluant les récepteurs β 2-adrénergique, μ -opioïd, endothéline A, dopamine de type 1 et α_{1B} -adrénergique, démontrent une plus grande affinité pour la β -

arrestine-2 que pour la β -arrestine-1. De plus, ces récepteurs interagissent de façon transitoire avec la β -arrestine ce qui va permettre leur recyclage à la membrane en quelques minutes (Figure 28) (Shenoy and Lefkowitz, 2003a). Les récepteurs de la classe B, incluant les récepteurs V2 de la vasopressine, angiotensine de type 1, neurokinine de type 1, neurotensine et hormone de libération de la TSH (thyroid stimulating hormone), quant à eux, possèdent sensiblement la même haute affinité pour la β -arrestine-2 et la β -arrestine-1. De plus, ces récepteurs restent en interaction avec la β -arrestine pour plusieurs heures dans les endosomes avant d'être ciblés pour la dégradation ou lentement recyclés (Figure 28) (Shenoy and Lefkowitz, 2003a). Le paramètre majeur qui détermine à quelle classe le récepteur appartiendra est la présence de plusieurs sites de phosphorylation dans l'extrémité C-terminal (Oakley et al., 2001). En effet, les récepteurs qui présentent plusieurs sites de phosphorylation dans leur extrémité C-terminal, comme le récepteur V2 de la vasopressine, restent en association plus longtemps avec la β -arrestine dans les endosomes et appartiennent donc à la classe B. De plus, il fut démontré que l'échange de l'extrémité C-terminal d'un récepteur de classe A, le récepteur β 2-adrénergique, avec un récepteur de classe B, le récepteur V2 de la vasopressine, permet de changer le sort du récepteur une fois internalisé (Oakley et al., 1999). Alors suite à ce changement, les récepteurs V2 mutants de la vasopressine sont recyclés alors que les récepteurs β 2-adrénergiques mutants restent en association avec la β -arrestine dans les endosomes.

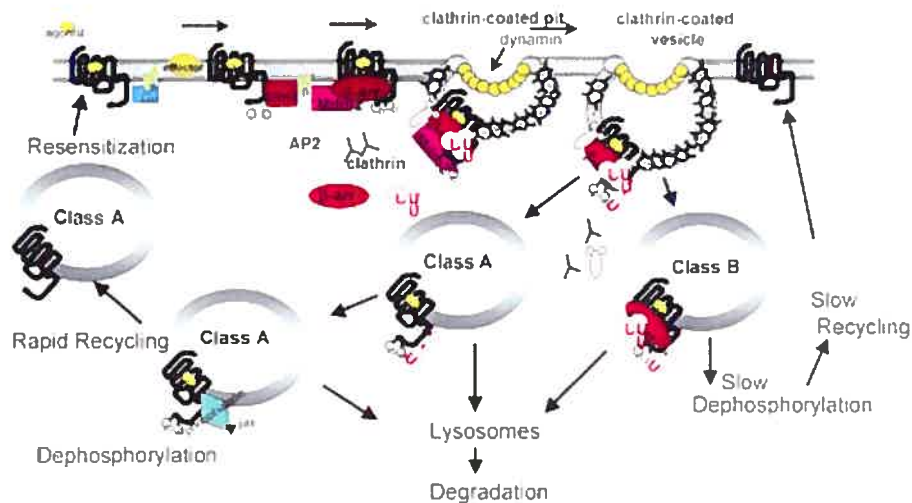


Figure 28 : Internalisation des récepteurs de la classe A versus la classe B

Une fois activés, les récepteurs sont phosphorylés par les GRK et recrutent la β -arrestine pour finalement être ciblés aux puits de clathrines et être internalisés. Une fois internalisés, les récepteurs de classe A se dissocient de la β -arrestine, sont déphosphorylés et recyclés à la membrane. Les récepteurs de classe B, quant à eux, restent en association pendant plusieurs heures avec la β -arrestine une fois internalisés et seront éventuellement dégradés par le lysosome ou lentement recyclés (Shenoy and Lefkowitz, 2003a).

Les fonctions endocytotiques de la β -arrestine-1 semblent être régulés par sa phosphorylation. En effet, à l'état basal dans le cytosol, la sérine 412 de la β -arrestine-1 est phosphorylée (Lin et al., 1997). Suite à sa translocation à la membrane, la β -arrestine-1 est rapidement déphosphorylée. De plus, un mutant de la β -arrestine mimant la phosphorylation (S412D) peut lier le récepteur β 2-adrénergiques et le désensibiliser mais lie très faiblement la clathrine inhibant l'endocytose. Comme les kinases responsables de la phosphorylation de la β -arrestine sont les ERK1-2 (Lin et al., 1999) et que la β -arrestine est une molécule d'échaffaudage pour les ERKs (Defea et al., 2000a; Defea et al., 2000b; Luttrell et al., 2001), il a été proposé que la phosphorylation de la β -arrestine pourrait être un mécanisme de rétro-

inhibition pour la fonction des ERKs. La β -arrestine-2 peut aussi être phosphorylée sur la thréonine 383 et la sérine 361 par la caséine kinase II (Kim et al., 2002; Lin et al., 2002). Tout comme la β -arrestine-1, la phosphorylation/déphosphorylation semble être importante pour sa fonction dans l'endocytose, plus particulièrement l'interaction avec la clathrine, tel que démontré pour le récepteur β 2-adrénergique (Lin et al., 2002).

La β -arrestine présente aussi des modifications post-traductionnelles qui permettent de réguler ses fonctions endocytotiques. Par exemple, il fut démontré que la β -arrestine-2 et le récepteur β 2-adrénergiques sont rapidement ubiquitinés en réponse à l'agoniste (Shenoy et al., 2001). L'ubiquitination de la β -arrestine-2 est dépendante de la E3 ligase Mdm2 (murine double minute clone 2) qui lie directement la β -arrestine tandis que l'ubiquitination du récepteur se fait par une autre ligase encore inconnue. L'ubiquitination de la β -arrestine est nécessaire à l'internalisation du récepteur alors que l'ubiquitination du récepteur est requise pour sa dégradation mais pas pour son internalisation. De plus, la β -arrestine est rapidement déubiquitinée suite à la dissociation du récepteur, dont le temps varie selon la classe du récepteur (classe A : rapide; classe B : plusieurs heures) (Shenoy and Lefkowitz, 2003b).

D'autres récepteurs couplés aux protéines G peuvent aussi être ubiquitinés suite à leur activation par le ligand (Wojcikiewicz, 2004). Dans ces cas, l'ubiquitination contrôle le triage du récepteur endocytosé vers le lysosome ou le protéasome afin d'être dégradé (Marchese and Benovic, 2001; Martin et al., 2003; Shenoy et al., 2001).

3.4 Internalisation

Comme mentionné plus tôt, suite au recrutement de la β -arrestine au récepteur, le récepteur est internalisé. Ce processus s'effectue grâce à plusieurs protéines accessoires (Figure 28), par exemple, AP-2 et la clathrine tel que décrit précédemment ainsi que la dynamine. La dynamine est une grande GTPase qui permet le détachement de la vésicule de la membrane. La dynamine est recrutée au récepteur grâce à la protéine amphiphysine qui permet la liaison de la dynamine avec la clathrine et AP-2 (McMahon et al., 1997; Ramjaun and McPherson, 1998; Slepnev et al., 1998; Wang et al., 1995). La fission se produit grâce à l'oligomérisation de la dynamine, entraînant une augmentation de l'hydrolyse du GTP (Warnock et al., 1996) et l'étirement du point d'attachement de la vésicule jusqu'à la déstabilisation de la membrane et le détachement (Stowell et al., 1999).

Une fois internalisés, les récepteurs sont amenés dans les vésicules endocytiques afin d'être soit déphosphorylés pour permettre leur recyclage ou ciblés pour la dégradation (Figure 28). Comme décrit précédemment, le niveau de phosphorylation du récepteur dictant la stabilité de l'interaction avec la β -arrestine joue un grand rôle dans le sort du récepteur une fois dans les vésicules endocytiques mais d'autres mécanismes sont aussi impliqués, telle l'ubiquitination de la β -arrestine ou du récepteur. De plus, certains motifs dans l'extrémité C-terminal ont été identifiés pour plusieurs récepteurs couplés aux protéines G comme important dans l'endocytose puisqu'ils vont interagir avec GASP, une protéine permettant le triage suite à l'endocytose (Heydorn et al., 2004; Simonin et al., 2004; Whistler et al., 2002).

Afin de permettre au récepteur d'être recyclé à la membrane, le récepteur doit être déphosphorylé et dissocié de l'agoniste. Par exemple, le récepteur β 2-adrénérgique internalise dans les vésicules endocytotiques très acides (Krueger et al., 1997) et enrichis en phosphatase PP2A (Pitcher et al., 1995) afin de favoriser la déphosphorylation. La β -arrestine semble aussi être impliquée dans le processus de recyclage des récepteurs à la membrane. En effet, en l'absence de la β -arrestine, le recyclage de certains récepteurs semble défectueux et l'explication la plus plausible serait la nécessité de la β -arrestine dans le recrutement de protéines adaptatrices, phosphatases et autres molécules nécessaires au recyclage (Vines et al., 2003).

Les récepteurs couplés aux protéines G peuvent aussi être internalisé par une voie alternative (Claing et al., 2002), par exemple, les récepteurs de l'endothéline B (Claing et al., 2000), VIP1 (Claing et al., 2000), cholecystokinine (Roettger et al., 1995) et bien d'autres. En effet, plusieurs récepteurs se situent dans des zones de la membrane riche en cholestérol, connues sous le nom de caveolae. Ces régions contiennent aussi des protéines impliquées dans la formation de vésicules de clathrine. Le mécanisme qui permet le bourgeonnement et l'internalisation de la vésicule n'est pas bien connu à part la nécessité de la dynamine et la présence de cholestérol dans la membrane.

Il semble y avoir aussi une autre voie d'internalisation mais cette fois indépendante de la β -arrestine et de la dynamine. Par exemple, les récepteurs M2 muscarinique, bradykinine de type 2 et du peptide N-formyl peuvent internalisés en présence de dominants négatifs de la β -arrestine et de la dynamine (Claing et al., 2000; Gilbert et al., 2001; Lamb et

al., 2001; Mundell and Benovic, 2000; Pals-Rylaarsdam et al., 1997; Vogler et al., 1999).

Cependant, le mécanisme exact par lequel ces récepteurs internalisent demeure inconnu.

Chapitre 4

Chaperons pharmacologiques

Au cours de ma thèse, j'ai eu l'opportunité d'écrire 2 articles de revue portant sur les chaperons pharmacologiques. Ces deux revues feront l'objet de mon 4^e chapitre d'introduction.

La première revue traite les chaperons pharmacologiques en général. Cette revue retrace l'histoire de la découverte des chaperons pharmacologiques. En outre, les effets originaux qui ont amenés à cette découverte, tels la température et les chaperons chimiques, sont revus. Plusieurs exemples de protéines mutantes pour lesquelles des chaperons pharmacologiques ont été testés sont aussi discutés.

La deuxième revue porte plus particulièrement sur les récepteurs couplés aux protéines G. La récupération fonctionnelle de récepteurs couplés aux protéines G mutants, tels le récepteur V2 de la vasopressine, la rhodopsine et le récepteur GnRH (gonadotropin-releasing hormone), à l'aide de chaperons pharmacologiques est discutée en détails. De plus, dans cette revue, l'effet des chaperons pharmacologiques sur les protéines de type sauvage mais présentant une mauvaise maturation est aussi traité. Finalement, cette revue discute un peu du mécanisme d'action possible des chaperons pharmacologiques.

Article de revue

**4.1 Pharmacological chaperones : potential
treatment for conformational diseases**

Virginie Bernier, Monique Lagacé, Daniel G. Bichet et Michel Bouvier

Publié dans Trends in Endocrinology and Metabolism

Juillet 2004, 15(5), p.222-228

Pharmacological chaperones: potential treatment for conformational diseases

Virginie Bernier^{1,2}, Monique Lagacé¹, Daniel G. Bichet² and Michel Bouvier¹

¹Département de Biochimie and Le Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome, Université de Montréal, H3T 1J4, Canada

²Unité de Recherche Clinique, Centre de Recherche et Service de Néphrologie, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal and Département de Médecine, Université de Montréal, H4J 1C5, Canada

Increasing numbers of inherited diseases are found to result from mutations that lead to misfolded proteins. In many cases, the changes in conformation are relatively modest and the function of the protein would not be predicted to be affected. Yet, these proteins are recognized as 'misfolded' and degraded prematurely. Recently, small molecules known as chemical and pharmacological chaperones were found to stabilize such mutant proteins and facilitate their trafficking to their site of action. Here, we review the recent published evidence suggesting that pharmacological chaperones represent promising avenues for the treatment of endocrine and metabolic diseases such as hyperinsulinemic hypoglycemia, hypogonadotropic hypogonadism and nephrogenic diabetes insipidus, and might become a general therapeutic strategy for the treatment of conformational diseases.

Conformational diseases are inherited pathologies resulting from mutations that, although not directly affecting the functional domain of proteins, interfere with their proper trafficking [1,2]. These mutations could lead to either the accumulation of aggregated forms of the protein that become toxic for the cell [3] or to proteins that are recognized as improperly folded and prematurely cleared by the quality control systems [4]. An increasing number of studies indicate that low molecular weight compounds can inhibit aggregation and/or enable the mutant proteins to escape the quality control systems so that their function can be rescued. These small molecules were named chemical chaperones and it is thought that they non-selectively stabilize the mutant proteins and facilitate their folding [5]. More recently, compounds such as receptor ligands or enzyme inhibitors, which selectively recognize the mutant proteins, were also found to rescue conformational mutants and were termed pharmacological chaperones [6–8]. Increasing evidence suggests that the action of pharmacological chaperones could be generalized to a large number of misfolded proteins, thus representing promising therapeutic avenues for the treatment of conformational diseases. Here, we review this evidence with a special emphasis on mutations responsible for endocrine and metabolic diseases.

Protein quality control systems

Numerous quality control mechanisms have evolved to protect living organisms against aberrant cellular activity. These systems are present to ensure that only completely and correctly folded proteins can reach their site of action. They require the participation of numerous accessory proteins known as molecular chaperones that, in addition to assisting protein folding, sense various 'folding markers' [9]. Proteins that are recognized as improperly or incompletely folded are generally targeted for degradation through the proteasome pathway.

Although highly efficient in most cases, these quality control systems are imperfect. In some cases, misfolded proteins, probably as a result of an alternative stable folding intermediate, can escape the degradation pathway and accumulate as aggregates, leading to the formation of fibrillar deposits known as amyloids [10]. In other cases, proteins harboring modest mutations not compromising their functional integrity may be recognized as misfolded, leading to their unnecessary degradation and resulting in a loss of function phenotype. These two types of quality control defect have been linked to the etiology of an increasing list of congenital and acquired conformational diseases. In parallel, efforts to overcome these defects have led to the development of various interventions that successfully rescue proteins from both misfolding/aggregation and misfolding/degradation pathways.

Manipulating the quality control systems

The first evidence suggesting that the protein quality control systems could be manipulated came from studies carried out with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). Mutations of this chloride channel cause cystic fibrosis, a disease characterized by the inability of epithelial cells to secrete chloride, which leads to the production of thick and viscous mucus that causes severe functional obstruction of lungs and pancreas. One of these mutations, a deletion of a single phenylalanine in the third intracellular loop of the channel ($\Delta F508$), is found in > 90% of affected patients, and leads to channels that are recognized as misfolded, retained in the endoplasmic reticulum (ER) and rapidly degraded by the ubiquitin-dependent proteasomal system [11]. Early studies revealed that lowering the growth temperature of cells expressing $\Delta F508$ CFTR increased the quantity of

Corresponding author: M. Bouvier (michel.bouvier@umontreal.ca).

Available online 4 June 2004

functional channels transported at the cell surface [12]. This was interpreted as a kinetic effect resulting from a slowing down of the folding process, enabling a greater proportion of the mutant proteins to adopt a native conformation and escape the ER quality control and reach their proper site of action as functional channels.

Chemical chaperones

From the above observations, the effects of low molecular weight compounds, such as the cellular osmolytes glycerol and trimethylamine *N*-oxide, in addition to deuterated water, previously shown to stabilize the native conformation of several proteins, were tested [13,14]. Consistent with the kinetic hypothesis proposed above, the three compounds increased the maturation of the mutant protein and rescued the cAMP-activated chloride conductance of cells expressing $\Delta F508$ CFTR [13,14]. Although the precise mechanism of action is not yet completely understood, it is generally assumed that these small molecules stabilize a conformation capable of escaping the quality control system and thus are often referred to as chemical chaperones. Their ability to reduce the probability of nascent polypeptide to enter non-productive folding pathways has since been confirmed for several mutant proteins involved in conformational diseases (Table 1). However, none of the chemical chaperones shown to be active in cell systems could be used in clinical settings. This has led several investigators to search for more specific treatments that could be tolerated in humans.

Pharmacological chaperones

Early evidence and concept

The first indication that compounds selectively binding to intracellularly retained proteins could promote their proper folding and targeting came from work carried out on an energy-dependent transporter known as P-glycoprotein or multidrug resistance gene-1 product (MDR1). While characterizing synthetic mutations that resulted in ER retention and rapid degradation of the protein [15], Loo and Clarke found that treatments with substrates (vinblastine and capsaicin) or inhibitors (cyclosporin and verapamil) of the transporter led to the appearance of functional MDR1 at the cell surface [16]. This functional rescue was accompanied by a clear effect of the drugs on the extent of maturation of the neosynthesized MDR1, as indicated by the accumulation of fully glycosylated forms

of the protein, characteristic of proper Golgi processing. This led the authors to propose that the drug-binding site forms early during MDR1 biosynthesis and that occupation of this site could stabilize a folding intermediate in a near native conformation that can escape the quality control system [17]. This mechanism, which implies selective binding of ligands to immature forms of proteins to influence their folding, was later termed pharmacological chaperoning [18]. Although conceptually similar to chemical chaperoning, it also incorporates the notion of pharmacological selectivity. Indeed, only the folding of the protein that is selectively targeted by the ligand will be influenced. This difference between the two modes of action is illustrated in Figure 1. Such selectivity of action of the pharmacological chaperones could represent a significant advantage when one considers their potential use for disease-related mutations in clinical settings. Since this early demonstration of pharmacological chaperone action on synthetic mutations, the concept has been extended to several disease-related mutations (Table 2). Examples related to endocrine and metabolic diseases are discussed in the following sections.

Application to membrane proteins involved in disease states

Naturally occurring mutations in another ATP-dependent transporter, the copper transporting P-type ATPase (MNK), also led to ER retention of this protein, which normally shuttles between Golgi and plasma membrane. Patients carrying these mutations have copper transport deficits associated with connective tissue defects, neurological degeneration, mental retardation, seizures, osteoporosis and hypopigmentation, collectively known as Menkes disease [19]. In cells expressing one of the Menkes disease mutations (G1019D), copper supplementation enabled the transporter to leave the ER, to be processed in the Golgi and to reach the plasma membrane, suggesting that copper acts as a pharmacological chaperone [20]. A similar rescue was also seen upon treatment with the chemical chaperone glycerol or upon reduction of the growth temperature to 30 °C [20]. However, the functionality of the transporter was not assessed in this study and further investigations are required to determine whether Menkes mutations can be functionally rescued.

For several other membrane proteins, however, functional rescue of disease-related mutations by a

Table 1. Chemical chaperones^a

Disease	Incidence	Protein	Agent used	Refs
Cancer	50–55% human cancers	Ubiquitin-activating enzyme E1	Glycerol, TMAO, D ₂ O	[14]
		Glucocorticoid receptor	TMAO	[43]
		p53	Glycerol, TMAO, D ₂ O	[14]
		pp60	Glycerol, TMAO, D ₂ O	[14]
Cystic fibrosis	1/2500	CFTR	Glycerol, TMAO, DMSO	[13,14]
Emphysema and liver disease	1/500	α 1-antitrypsin	Glycerol	[44]
Machado-Joseph disease	> 1000 cases	Ataxin-3	Glycerol, TMAO, DMSO	[45]
Maple syrup urine disease	1/100–300 000	BCKD complex	TMAO	[46]
Menkes disease	1/50 000	MNK	Glycerol	[20]
Nephrogenic diabetes insipidus	1/250 000	Aquaporin-2	Glycerol, TMAO, DMSO	[47]
		V2R	Glycerol	[48]

^aAbbreviations: BCKD, mitochondrial branched-chain α -ketoacid dehydrogenase; CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; DMSO, dimethyl sulfoxide; MNK, Menkes protein; TMAO, trimethylamine *N*-oxide; V2R, V2 vasopressin receptor.

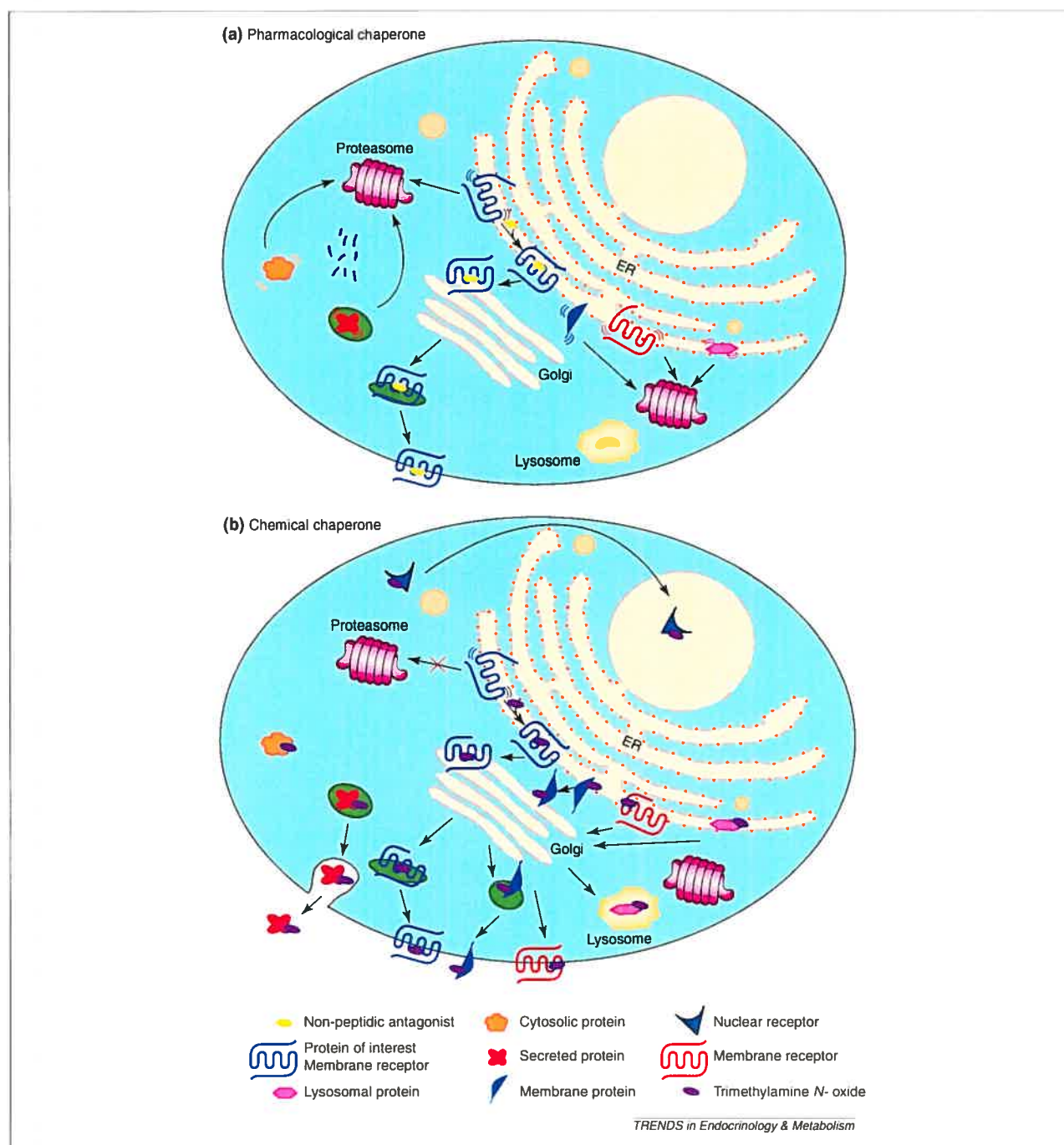


Figure 1. Comparison of chemical and pharmacological chaperone modes of action. In the hypothetical case considered, the disease-related misfolded protein is a G-protein-coupled receptor (GPCR) retained in the endoplasmic reticulum (ER). In the absence of pharmacological or chemical chaperones, the misfolded GPCR is retrotranslocated in the cytosol where it will be degraded by the proteasome alongside many other misfolded proteins. (a) Treatment with a pharmacological chaperone, such as a selective non-peptidic antagonist of the misfolded GPCR. After its diffusion into the cell and the ER lumen, the antagonist specifically binds to the GPCR, favoring its folding in a conformation that is released by the ER quality control system, allowing the receptor to transit through the Golgi apparatus and reach the cell surface. The binding selectivity of the antagonist is such that it will not affect the beneficial degradation of the other misfolded or incompletely folded proteins that need to be eliminated. (b) Treatment with a chemical chaperone, such as the osmolyte trimethylamine N-oxide. After its diffusion into the cell, the osmolyte can assist the folding of many different proteins in various cellular compartments without specificity for the disease-related protein. Although this will have the desired effect on the GPCR, it might also lead to inappropriate changes in the levels of many proteins and even favor the accumulation of mutant proteins, which could be detrimental to the cell.

pharmacological chaperone has been well documented. One example is provided by the sulfonylurea receptor-1 (SUR1), which in association with Kir6.2, forms the ATP-sensitive potassium channel of the pancreatic β cell [21].

Indeed, treatment with the channel opener, diazoxide, restored cell surface targeting and function of SUR1 R1394H, a mutant form that is normally retained in the trans-Golgi network [22] and is responsible for the

Table 2. Pharmacological chaperones*

Disease	Incidence	Protein	Agent used	Refs
Misfolding/aggregation				
Gaucher disease	1/100 000	β -Glu	N-(<i>n</i> -nonyl)deoxynojirimycin	[35]
β -Galactosidosis	1/100–320 000	β -Gal	Galactonojirimycin derivatives	[32,33]
Long QT syndrome	1/7000	HERG K ⁺ channel	Cisapride, E-4031, astemizole	[49]
Prion disease	1/1 000 000	Prion	IPrP13	[50]
			Quinacrine	[51,52]
			Chlorpromazine	[51]
Retinitis pigmentosa	1/3500	Rhodopsin	11- <i>cis</i> – 7-ring retinal	[53]
Transthyretin amyloid disease	Unknown	Transthyretin	Amyloidosis inhibitors	[54]
Misfolding/degradation				
Cancer		Smo	Cyclopamine	[55]
Cystic fibrosis	1/2500	CFTR	Benzo(c)quinolizinium compounds	[36,37]
Fabry	1/400 000	α -Gal A	DGJ	[29]
			Galactose	[30]
Hyperinsulinemic hypoglycemia	1/50 000	SUR1	Diazoxide	[22]
Hypogonadotropic hypogonadism	F: 1/10 000 M: 1/1000	GnRHR	GnRH peptidomimetic antagonist	[26]
Drug resistance		P-glycoprotein	Cyclosporin, capsaicin, vinblastine, verapamil	[16]
Immunoglobulin secretion		Anti-phenylphosphocholine	Hapten <i>p</i> -nitrophenylphosphocholine	[56]
Pain		δ OR	Naltrexone	[57]
Menkes disease	1/50 000	MNK	Copper	[20]
Nephrogenic diabetes insipidus	1/250 000	V2R	SR121463, VPA-985	[18]

*Abbreviations: α -Gal A, α -galactosidase A; β -Gal, β -galactosidase; β -Glu, β -glucosidase; CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; δ OR, δ -opioid receptor; DGJ, 1-deoxy-galactonojirimycin; F, females; GnRH, gonadotropin-releasing hormone; GnRHR, gonadotropin-releasing hormone receptor; HERG, ether-a-gogo-related gene; IPrP13, 13-residue β -sheet breaker peptide; M, males; MNK, Menkes protein; Smo, smoothened; SUR1, sulfonylurea receptor-1; V2R, V2 vasopressin receptor.

development of persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy [23].

Application to G-protein-coupled receptors

Additional examples of compounds acting as pharmacological chaperones come from the largest family of pharmacological targets, the G-protein-coupled receptors (GPCRs). The first illustration was provided by work carried out on mutant forms of the V2 vasopressin receptor (V2R), which are responsible for nephrogenic diabetes insipidus (NDI). This X-linked disease is characterized by resistance of the kidney to the action of antidiuretic hormone, preventing afflicted patients from normally concentrating their urine [24]. In the most severe NDI cases, urinary volumes can reach 20 l d⁻¹ and belatedly diagnosed children can suffer several rounds of dehydration that can impede growth, leading to mental retardation and eventually death. From the more than 150 different V2R mutations that have been linked to this disease, a large proportion of those tested (70%) were found to be impaired in their cell surface trafficking. Although some of these mutations would lead to aberrant proteins that would be expected to be cleared by the quality control systems, many of them involve substitution or small deletions in regions that would not be predicted to cause general misfolding [24]. This led Morello *et al.* to test whether, in heterologous expression systems, treatment with two cell-permeable antagonists (SR121463 and VPA-985) could promote cell surface targeting and functional rescue of eight of the 12 ER-retained mutant receptors examined [18]. In this case, the site of action of the drugs was documented. Indeed, a peptidic antagonist (which cannot penetrate membranes) could neither mimic nor block the action of SR121463 and VPA-985, suggesting that the compounds acted intracellularly, probably by binding to the receptor in the ER. This conclusion was also

supported by the observation that SR121463 led to proper V2R maturation, as indicated by the accumulation of fully glycosylated forms of the receptor. The potential clinical use of vasopressin antagonists in the treatment of NDI is currently under investigation.

Another example of disease-related GPCR mutants rescued by pharmacological chaperones is provided by the gonadotropin-releasing hormone receptors (GnRHRs) [25]. Indeed, several of the mutant receptor forms, which leads to hypogonadotropic hypogonadism as a result of their lack of cell surface expression, are trafficked to the plasma membrane, where they restore GnRHR responsiveness, following treatment with receptor antagonists [26]. Although three chemically distinct classes of small non-peptidic GnRHR antagonists successfully rescued the mutant receptors, none of the peptidic antagonists did, supporting the notion that compounds need to penetrate the cells to act as pharmacological chaperones.

Although the examples discussed so far suggest that pharmacological chaperones could represent promising therapeutic agents, all these studies were carried out in cellular systems and their real therapeutic value still remains to be investigated. However, as will be discussed in the next section, a few studies carried out in animals and humans suggest that the concept of pharmacological chaperones does hold promise.

Application to lysosomal storage diseases

Lysosomal storage diseases represent a class of pathology for which the therapeutic potential of pharmacological chaperones has been most explored. These diseases, associated with abnormal metabolism of substances such as glycosphingolipids, glycogen, mucopolysaccharides and glycoproteins, result from mutations of lysosomal enzymes. The first example of the potential efficacy of pharmacological chaperones in a lysosomal storage

disease came from work on Fabry disease, a condition resulting from mutations in the lysosomal α -galactosidase A (α -Gal A), which lead to the accumulation of undegraded glycosphingolipids and precipitate renal failure, myocardial infarction and strokes [27]. While studying two mutations, R301Q and Q279E, shown to produce an α -Gal A retained in the ER [28], Fan *et al.* found that treatment with the α -Gal A inhibitor, 1-deoxy-galactonojirimycin (DGJ), enhanced the activity of the enzyme detected in Fabry patient's lymphoblasts as a result of increased maturation and lysosomal targeting. In animal studies, oral administration of DGJ for four days increased α -Gal A activity in heart, spleen, kidney and liver of transgenic mice synthesizing the human R301Q mutant enzyme [29], confirming the effectiveness of the treatment *in vivo*. Using a different inhibitor, Frustaci *et al.* showed that treatment of a patient harboring another ER-retained form of α -Gal A (G328R) with galactose for three days significantly increased α -Gal A activity detected in lymphocytes isolated from coronary-sinus blood [30]. After three months of treatment, the patient's cardiac contractility was significantly improved and his cardiac mass was reduced by 20%. These improvements persisted for more than two years after treatment, indicating that the pharmacological chaperone treatment could be considered for long-term therapies.

Other studies using animals were carried out on mutant forms of β -galactosidase (β -Gal) that are associated with various manifestations of β -galactosidosis, another lysosomal storage disease [31]. They took advantage of β -Gal-deficient knockout mouse fibroblasts to produce various mutant forms of the human enzyme and test the potential pharmacological chaperone action of three β -Gal inhibitors, DGJ [32], *N*-(*n*-butyl)-deoxy-galactonojirimycin [32] and *N*-octyl-4-epi- β -valien-amine [33]. They found that the three compounds increased the enzyme activity for the six mutants tested. The enzymatic activity-enhancing effects of the compounds could also be confirmed in human β -galactosidosis fibroblasts for two of the mutants.

Even though not tested in either patients or animals, a therapeutic strategy involving pharmacological chaperones could also be considered for the most prevalent lysosomal storage disorder, Gaucher disease. This disease, which results from mutations in lysosomal β -glucosidase (β -Glu), leads to the accumulation of glucosylceramide in macrophages and the development of hepatosplenomegaly, anemia, skeletal lesions and central nervous system dysfunctions [34]. Treatment of fibroblasts derived from patients harboring the most common mutation causing this disease (N370S) with the enzyme inhibitor, *N*-(*n*-nonyl)deoxynojirimycin, led to a twofold increase in the β -Glu activity [35].

The successes obtained in the treatment of different lysosomal diseases in animals and humans using pharmacological chaperones can clearly be seen as a 'proof of principle' that such molecules can be of use in the therapeutic treatment of conformational diseases.

Screening efforts

Channels, GPCRs and enzymes with a rich pharmacopoeia represent special cases where the search for compounds that could act as pharmacological chaperones is relatively

simple. However, for proteins that have few or no known ligands, such as transporters exemplified by CFTR or MNK, screening campaigns will be required to identify potential candidates. These could include screens that are based either on the functional rescue of the targeted protein or its proper cellular localization. One example where such screens could soon lead to the identification of a clinically useful pharmacological chaperone is provided by CFTR. Indeed, studies carried out both in cells transfected with CFTR mutants and in native airway cells from cystic fibrosis patients revealed that benzoquinolizinium compounds that activate wild-type CFTR could also partially restore apical plasma membrane relocalization and chloride channel activity of the ER-retained Δ F508 CFTR mutant [36]. More recently, high-throughput screening of combinatorial libraries based on flavone and benzoquinolizinium compounds identified higher-affinity activators and inhibitors of CFTR activity [37] that would be worth testing as potential pharmacological chaperones for Δ F508 CFTR or other ER-retained CFTR mutants in the search for new drug candidates for the treatment of cystic fibrosis.

Many other endocrine and metabolic diseases such as Tangier disease [38], Zellweger syndrome [39], Tay-Sachs disease [40], Pendred syndrome [41] and adrenal hyperplasia [42] result from mutations that impair the folding of proteins. However, to our knowledge, no pharmacological chaperones have been identified yet for these proteins, making them excellent candidates for screening campaigns aimed at identifying small molecules that would assist their folding.

Conclusion

The increasing number of examples showing that small molecules facilitate the folding and processing of proteins suggests that it might be a general phenomenon that could be applied to a large variety of proteins and conditions, thus having great potential therapeutic value.

Such small molecules can be divided into two classes: the chemical chaperones, which act as generic stabilizers of folding intermediates for all proteins, and the pharmacological chaperones, which show selectivity of action by binding and stabilizing only the targeted protein. Although chemical chaperones are not good drug candidates, pharmacological chaperones offer promising avenues for the development of clinically useful compounds. This is particularly true when the targeted protein has already been shown to be 'drugable' and when ligands, with good specificity profiles, that are well tolerated in humans, are already available or in development. The fact that these molecules have been shown to rescue the maturation and function of many distinct mutant forms of the same proteins might simplify the development of drugs for these diseases. Indeed, this suggests that it will not be necessary to develop distinct molecules for each of the mutations, but rather that one unique compound could be active for large subsets of mutations.

Although examples of pharmacological chaperones that have been used in clinical settings [30] are still very limited, the multiplication of proof of principle obtained in cellular systems and animals indicates that the next few years should be fertile in clinical studies. A few small

clinical trials for conformational diseases such as NDI, Gaucher and Fabry diseases have been initiated already or will be begun soon. More trials are to be expected, along with screening campaigns aimed at identifying clinically useful new pharmacological chaperones.

References

- Carrell, R.W. and Lomas, D.A. (1997) Conformational disease. *Lancet* 350, 134–138
- Kopito, R.R. and Ron, D. (2000) Conformational disease. *Nat. Cell Biol.* 2, E207–E209
- Selkoe, D.J. (2003) Folding proteins in fatal ways. *Nature* 426, 900–904
- Sitja, R. and Braakman, I. (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature* 426, 891–894
- Welch, W.J. and Brown, C.R. (1996) Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding. *Cell Stress Chaperones* 1, 109–115
- Morello, J.P. et al. (2000) Pharmacological chaperones: a new twist on receptor folding. *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 466–469
- Cohen, F.E. and Kelly, J.W. (2003) Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases. *Nature* 426, 905–909
- Conn, P.M. et al. (2002) Protein origami: therapeutic rescue of misfolded gene products. *Mol. Intervent.* 2, 308–316
- Smith, D.F. et al. (1998) Molecular chaperones: biology and prospects for pharmacological intervention. *Pharmacol. Rev.* 50, 493–514
- Soto, C. (2003) Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 49–60
- Kopito, R.R. (1999) Biosynthesis and degradation of CFTR. *Physiol. Rev.* 79, S167–S173
- Denning, G.M. et al. (1992) Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature* 358, 761–764
- Sato, S. et al. (1996) Glycerol reverses the misfolding phenotype of the most common cystic fibrosis mutation. *J. Biol. Chem.* 271, 635–638
- Brown, C.R. et al. (1996) Chemical chaperones correct the mutant phenotype of the $\Delta F508$ cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein. *Cell Stress Chaperones* 1, 117–125
- Loo, T.W. and Clarke, D.M. (1994) Prolonged association of temperature-sensitive mutants of human P-glycoprotein with calnexin during biogenesis. *J. Biol. Chem.* 269, 28683–28689
- Loo, T.W. and Clarke, D.M. (1995) P-glycoprotein. Associations between domains and between domains and molecular chaperones. *J. Biol. Chem.* 270, 21839–21844
- Loo, T.W. and Clarke, D.M. (1999) Determining the structure and mechanism of the human multidrug resistance P-glycoprotein using cysteine-scanning mutagenesis and thiol- modification techniques. *Biochim. Biophys. Acta* 1461, 315–325
- Morello, J.P. et al. (2000) Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants. *J. Clin. Invest.* 105, 887–895
- Kaler, S.G. (1998) Diagnosis and therapy of Menkes syndrome, a genetic form of copper deficiency. *Am. J. Clin. Nutr.* 67, 1029S–1034S
- Kim, B.E. et al. (2002) A conditional mutation affecting localization of the Menkes disease copper ATPase. Suppression by copper supplementation. *J. Biol. Chem.* 277, 44079–44084
- Thomas, P.M. et al. (1995) Mutations in the sulfonylurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Science* 268, 426–429
- Partridge, C.J. et al. (2001) Identification and pharmacological correction of a membrane trafficking defect associated with a mutation in the sulfonylurea receptor causing familial hyperinsulinism. *J. Biol. Chem.* 276, 35947–35952
- Huopio, H. et al. (2002) K(ATP) channels and insulin secretion disorders. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283, E207–E216
- Morello, J.P. and Bichet, D.G. (2001) Nephrogenic diabetes insipidus. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 607–630
- Ulloa-Aguirre, A. et al. (2003) Misrouted cell surface receptors as a novel disease aetiology and potential therapeutic target: the case of hypogonadotropic hypogonadism due to gonadotropin-releasing hormone resistance. *Expert Opin. Ther. Targets* 7, 175–185
- Janovick, J.A. et al. (2002) Rescue of hypogonadotropic hypogonadism-causing and manufactured GnRH receptor mutants by a specific protein-folding template: misrouted proteins as a novel disease etiology and therapeutic target. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 3255–3262
- Desnick, R.J. et al. (2001) α -Galactosidase A deficiency: Fabry disease. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver, C.R. et al., eds), pp. 9733–3774, McGraw-Hill
- Ishii, S. et al. (1996) Aggregation of the inactive form of human α -galactosidase in the endoplasmic reticulum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220, 812–815
- Fan, J.Q. et al. (1999) Accelerated transport and maturation of lysosomal α -galactosidase A in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor. *Nat. Med.* 5, 112–115
- Frustaci, A. et al. (2001) Improvement in cardiac function in the cardiac variant of Fabry's disease with galactose-infusion therapy. *N. Engl. J. Med.* 345, 25–32
- Suzuki, Y. et al. (2001) β -Galactosidase deficiency (β -galactosidosis): GM1-gangliosidosis and Morquio B disease. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver, C.R. et al., eds), pp. 3775–3809, McGraw-Hill
- Tominaga, L. et al. (2001) Galactonjirimycin derivatives restore mutant human β -galactosidase activities expressed in fibroblasts from enzyme-deficient knockout mouse. *Brain Dev.* 23, 284–287
- Matsuda, J. et al. (2003) Chemical chaperone therapy for brain pathology in GM1-gangliosidosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 15912–15917
- de Fost, M. et al. (2003) Gaucher disease: from fundamental research to effective therapeutic interventions. *Neth. J. Med.* 61, 3–8
- Sawkar, A.R. et al. (2002) Chemical chaperones increase the cellular activity of N370S β -glucosidase: a therapeutic strategy for Gaucher disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 15428–15433
- Dormer, R.L. et al. (2001) Correction of $\Delta F508$ -CFTR activity with benzoc(quinolinizinium) compounds through facilitation of its processing in cystic fibrosis airway cells. *J. Cell Sci.* 114, 4073–4081
- Galiotta, L.J. et al. (2001) Novel CFTR chloride channel activators identified by screening of combinatorial libraries based on flavone and benzoquinolinizinium lead compounds. *J. Biol. Chem.* 276, 19723–19728
- Neufeld, E.B. et al. (2004) The ABCA1 transporter modulates late endocytic trafficking: insights from the correction of the genetic defect in Tangier disease. *J. Biol. Chem.* 279, 15571–15578
- Brosius, U. and Gartner, J. (2002) Cellular and molecular aspects of Zellweger syndrome and other peroxisome biogenesis disorders. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 1058–1069
- Myerowitz, R. (1997) Tay-Sachs disease-causing mutations and neutral polymorphisms in the Hex A gene. *Hum. Mutat.* 9, 195–208
- Shaukat, S. et al. (2003) Syndromic and non-syndromic deafness, molecular aspects of Pendred syndrome and its reported mutations. *J. Ayub Med. Coll. Abbottabad* 15, 59–64
- Speiser, P.W. and White, P.C. (2003) Congenital adrenal hyperplasia. *N. Engl. J. Med.* 349, 776–788
- Baskakov, I.V. et al. (1999) Trimethylamine N-oxide-induced cooperative folding of an intrinsically unfolded transcription-activating fragment of human glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 274, 10693–10696
- Burrows, J.A. et al. (2000) Chemical chaperones mediate increased secretion of mutant $\alpha 1$ -antitrypsin ($\alpha 1$ -AT) Z: a potential pharmacological strategy for prevention of liver injury and emphysema in $\alpha 1$ -AT deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 1796–1801
- Yoshida, H. et al. (2002) Chemical chaperones reduce aggregate formation and cell death caused by the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. *Neurobiol. Dis.* 10, 88–99
- Song, J.L. and Chuang, D.T. (2001) Natural osmolyte trimethylamine N-oxide corrects assembly defects of mutant branched-chain α -ketoacid decarboxylase in maple syrup urine disease. *J. Biol. Chem.* 276, 40241–40246
- Tamarappoo, B.K. et al. (1999) Misfolding of mutant aquaporin-2 water channels in nephrogenic diabetes insipidus. *J. Biol. Chem.* 274, 34825–34831
- Tan, C.M. et al. (2003) Appropriate polarization following pharmacological rescue of v2 vasopressin receptors encoded by X-linked nephrogenic diabetes insipidus alleles involves a conformation of the receptor that also attains mature glycosylation. *J. Biol. Chem.* 278, 35678–35686

- 49 Curran, M.E. *et al.* (1995) A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* 80, 795–803
- 50 Soto, C. *et al.* (2000) Reversion of prion protein conformational changes by synthetic β -sheet breaker peptides. *Lancet* 355, 192–197
- 51 Korth, C. *et al.* (2001) Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 9836–9841
- 52 Ryou, C. *et al.* (2003) Differential inhibition of prion propagation by enantiomers of quinacrine. *Lab. Invest.* 83, 837–843
- 53 Noorwez, S.M. *et al.* (2003) Pharmacological chaperone-mediated *in vivo* folding and stabilization of the P23H-opsin mutant associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *J. Biol. Chem.* 278, 14442–14450
- 54 Hammarstrom, P. *et al.* (2003) Prevention of transthyretin amyloid disease by changing protein misfolding energetics. *Science* 299, 713–716
- 55 Chen, J.K. *et al.* (2002) Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to smoothened. *Genes Dev.* 16, 2743–2748
- 56 Wiens, G.D. *et al.* (2001) Recovering antibody secretion using a hapten ligand as a chemical chaperone. *J. Biol. Chem.* 276, 40933–40939
- 57 Petaja-Repo, U.E. *et al.* (2002) Ligands act as pharmacological chaperones and increase the efficiency of δ opioid receptor maturation. *EMBO J.* 21, 1628–1637

AGORA initiative provides free agriculture journals to developing countries

The Health Internetwork Access to Research Initiative (HINARI) of the WHO has launched a new community scheme with the UN Food and Agriculture Organization.

As part of this enterprise, Elsevier has given 185 journals to Access to Global Online Research in Agriculture (AGORA). More than 100 institutions are now registered for the scheme, which aims to provide developing countries with free access to vital research that will ultimately help increase crop yields and encourage agricultural self-sufficiency.

According to the Africa University in Zimbabwe, AGORA has been welcomed by both students and staff. 'It has brought a wealth of information to our fingertips' says Vimbai Hungwe. 'The information made available goes a long way in helping the learning, teaching and research activities within the University. Given the economic hardships we are going through, it couldn't have come at a better time.'

For more information visit:
<http://www.healthinternetwork.net>

Article de revue

**4.2 Pharmacological chaperone action on
G-protein-coupled receptors**

Virginie Bernier, Daniel G. Bichet et Michel Bouvier

Publié dans Current Opinion in Pharmacology

Octobre 2004, 4(5), p.528-533

Pharmacological chaperone action on G-protein-coupled receptors

Virginie Bernier^{1,2}, Daniel G Bichet² and Michel Bouvier^{1*}

An increasing number of genetic diseases are found to result from mutations that lead to retention of the affected proteins in the endoplasmic reticulum, where they are recognized as misfolded by the quality control system. Several of these conformational diseases involve mutations in G-protein-coupled receptors. Recent studies demonstrated that pharmacologically selective compounds, termed pharmacological chaperones, can stabilize the misfolded receptors, facilitating their export from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane, where they can be active. Such functional rescue suggests that pharmacological chaperones could represent novel therapeutic agents for the treatment of conformational diseases. Although only a few examples are currently available, the observation that pharmacological chaperones can also favour the folding of wild-type G-protein-coupled receptors indicates that these compounds could have wide applications.

Addresses

¹Département de Biochimie and Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

²Unité de Recherche Clinique, Centre de Recherche et Service de Néphrologie, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, Montréal, and Département de Médecine, Université de Montréal, Québec, Canada H4J 1C5

Current Opinion in Pharmacology 2004, 4:528–533

This review comes from a themed issue on
New technologies
Edited by Alan Cuthbert

Available online 23rd August 2004

1471-4892/\$ – see front matter
© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

DOI 10.1016/j.coph.2004.08.001

Abbreviations

AVP	arginine-vasopressin
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
ER	endoplasmic reticulum
GnRHr	gonadotropin-releasing hormone receptor
GPCR	G-protein-coupled receptor
NDI	nephrogenic diabetes insipidus
V ₂ R	V ₂ vasopressin receptor

Introduction

Conformational diseases often result from mutations in proteins that are recognized as misfolded by quality control systems [1,2]. Such recognition can lead to two

different phenotypes: some misfolded proteins can be efficiently ubiquitinated and degraded by the proteasome, leading to a loss of function [3], whereas others accumulate in cells, forming aggregates that can have toxic consequences and are often referred to as gain of functions [4]. Studies carried out in the past decade have linked these two types of quality control outcomes to the aetiology of a growing list of congenital and acquired conformational diseases. In parallel, efforts to overcome these defects have led to the development of various interventions that successfully rescue proteins from both aggregation and degradation pathways. In particular, treatments with chemical compounds known as either chemical or pharmacological chaperones have been found to stabilize some conformational mutants, promoting their proper transport to their site of action where, in many cases, they can be functional [5–7]. Identifying compounds that can bind to the mutant proteins has been easier for proteins such as channels and receptors for which selective ligands have already been characterized. Because of their involvement in many pathophysiological conditions and the rich pharmacological diversity generated through various drug screening campaigns, G-protein-coupled receptors (GPCRs) have attracted considerable attention for the identification of pharmacological chaperones. At least ten congenital diseases have been linked to mutations in GPCRs that lead to their retention in the endoplasmic reticulum (ER) (Table 1), and pharmacological chaperones have been identified for three of these (Table 2). Here, we review the studies that led to the discovery of these potential therapeutic agents, with a special emphasis on their proposed mechanisms of action.

The discovery of pharmacological chaperones acting on GPCRs

The first demonstration that pharmacologically selective agents could rescue cell surface expression and function of GPCR mutants, which were otherwise retained in the ER, came from work carried out on V₂ vasopressin receptor (V₂R) mutants responsible for nephrogenic diabetes insipidus (NDI). NDI is a rare X-linked disease characterized by a loss of antidiuretic response to the hormone arginine-vasopressin (AVP) that results in the inability of the affected patients to concentrate their urine, leading to large urinary output [8]. In infants, the water losses can lead to severe episodes of dehydration, resulting in growth and mental retardation and even death in the most extreme cases. To date, more than 175 different mutations distributed throughout the primary

Table 1

GPCR involved in conformational diseases.

GPCR	Diseases
Adrenocorticotrophic hormone receptor	Familial adrenocorticotrophic hormone resistance
Calcium sensing receptor	Familial hypocalciuric hypercalcemia
	Neonatal hyperparathyroidism
Endothelin-B	Hirschsprung disease
GnRHR	Hypogonadotropic hypogonadism
Luteinizing hormone receptor	Male pseudohermaphroditism
Melanocortin 4 receptor	Obesity
Rhodopsin	Retinitis pigmentosa
Thyroid-stimulating hormone receptor	Congenital hypothyroidism
V ₂ R	Nephrogenic diabetes insipidus

sequence of the receptor have been identified in NDI patients. Although some mutations were linked to losses of either hormone binding or G protein coupling, the majority of the mutant receptors (38 out of the 53 tested in heterologous expression systems; see Figure 1) appear to be recognized as misfolded proteins that are retained in the ER by the quality control system before being degraded [9–13]. Because many of these mutations are relatively modest and would not be predicted to grossly affect the functional sites of the protein, our group posed the hypothesis that promoting the escape of mutant proteins from the ER could be sufficient to restore AVP responsiveness. On the basis of previous findings that non-specific binding of chemical compounds such as DMSO, TMAO and glycerol (known as chemical chaperones) could stabilize the folding of other mutant proteins [14,15], we tested the idea that binding of a mutant receptor by a specific ligand could play a similar role and rescue both V₂R cell surface expression and function. Treatment of cells with the non-peptidic V₂R antagonists

SR121463 and VPA-985 restored cell surface expression of eight of the originally ER-retained V₂R mutants [16]. Since then, the effect of these and other V₂R antagonists were tested on additional NDI-associated V₂R mutants, leading to the cell surface expression of 11 out of 17 mutants tested to date ([16,17]; and Bernier VB, Bichet DG and Bouvier MB, unpublished observations). A summary of the subset of mutations that could be rescued by pharmacological chaperones is presented in Figure 1. Interestingly, an identical subset of mutations was rescued irrespective of the V₂R antagonist tested, indicating that binding to the receptor is sufficient for the chaperoning action of the ligands. By contrast, antagonists of the β 2-adrenergic or δ -opioid receptors were without effect on the cell surface expression of the V₂R mutants [18^{**}], confirming that receptor binding selectivity is required.

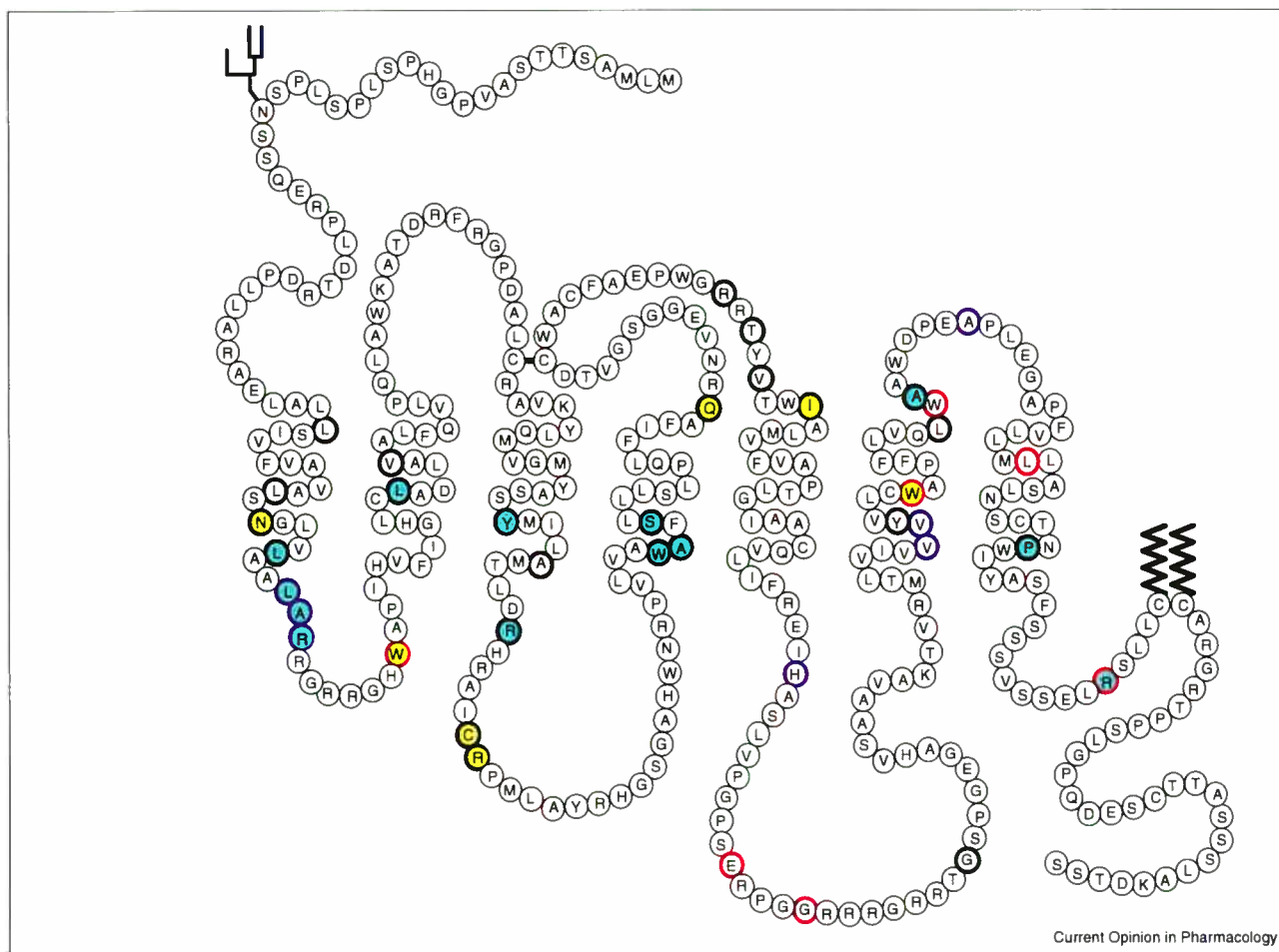
The restored cell surface expression promoted by V₂R antagonist treatment led to functional recovery of AVP responsiveness in all cases (although to different extents)

Table 2

Reported action of pharmacological chaperone on ER-retained GPCRs.

GPCR	Disease-related	Ligand used	Type	References
V ₂ R	Nephrogenic diabetes insipidus	SR121463	Antagonist	[16]
		VPA-985	Antagonist	[16]
		SR49059	Antagonist	[17]
GnRHR	Hypogonadotropic hypogonadism	Indoles	Antagonist	[25 [*]]
		Quilones	Antagonist	[25 [*]]
		Erythromycin-derived macrolides	Antagonist	[25 [*]]
δ -opioid receptor	Involved in pain	Buprenorphine	Agonist	[18 ^{**}]
		TAN-67	Agonist	[18 ^{**}]
		SNC-80	Agonist	[18 ^{**}]
		Bremazocine	Agonist	[18 ^{**}]
		Tonazocine	Agonist	[18 ^{**}]
		Nalbuphine	Agonist	[18 ^{**}]
		Naltrexone	Antagonist	[18 ^{**}]
		Naltriben	Antagonist	[18 ^{**}]
		Naltrindole	Antagonist	[18 ^{**}]
		Naloxone	Antagonist	[18 ^{**}]
Rhodopsin	Retinitis pigmentosa	11-cis-7-ring-retinal	Agonist	[30 ^{**}]
		9- or 11-cis-retinal	Agonist	[29]

Figure 1



Schematic representation of the V₂R. Amino acid sequence of the V₂R and its topographic representation at the plasma membrane. Shown are mutations identified in NDI patients that lead to ER retention of the receptor, including missense mutations (black circles), nonsense mutations (red circles), deletions or insertions (blue circles). The colour-filled circles indicate those mutations that were tested for the action of pharmacological chaperones (circles filled with green indicate receptors for which cell surface expression and function were rescued; circles filled with yellow indicate those that were not rescued).

following removal of the antagonist [16], confirming the hypothesis that the quality control system detected and retained mutant forms of the V₂R that would otherwise be active. Therefore, NDI patients harbouring these mutations are victims of the extreme sensitivity of the quality control system that can detect subtle mutations that would not, on their own, lead to complete loss of receptor function. The contribution of specific components of the quality control apparatus in the retention of partially misfolded mutant receptors was further confirmed by the observation that mutant V₂Rs remained associated for longer times with the molecular chaperone calnexin than did wild-type receptors [19].

These observations led us to propose that vasopressin antagonists acted by binding to the mutant receptors in

the ER, stabilizing them in intermediate states of their folding path that more closely resembled the native state of the wild-type receptor, thus allowing the escape from the stringent quality control. Such a mechanism of action that would involve an intracellular site of action was supported by the observation that a peptidic V₂R ligand which could not penetrate the cell was unable to mimic or block the rescuing effect of the non-peptidic ligands [16]. Biochemical analysis of the receptor species detected was also consistent with an ER site of action. Indeed, whereas ER-retained mutant receptors appeared largely as immature core-glycosylated receptor precursors, they were processed to fully mature receptors harbouring complex carbohydrate arborisation following treatment with the cell permeable V₂R antagonists [16]. The antagonist treatment also increased the turnover rate of the precursor

form of the receptor without affecting the half-life of the mature receptor, which is indicative of an action on the biosynthetic processes. Taken together with the pharmacological specificity of action described above, these observations contributed to the emergence of the concept that 'pharmacological chaperones' assist the folding and ER export of mutant GPCRs.

Generalization of the pharmacological chaperone action on GPCRs

Pharmacological chaperones were soon identified for another GPCR, the gonadotropin-releasing hormone receptor (GnRHR). Indeed, ER-retained mutant forms of GnRHR, which are responsible for hypogonadotropic hypogonadism, were rescued by treatment with selective non-peptidic GnRHR antagonists [20]. As with the V_2R , treatment with an antagonist (an indole known as IN3) was first shown to restore both cell surface expression and signaling activity of 11 of the 13 disease-linked mutant GnRHRs tested [21^{**},22]. In addition, a cell impermeable GnRHR peptidic antagonist could not mimic or block the beneficial effects of IN3, consistent with an intracellular site of action for pharmacological chaperones [21^{**}]. Interestingly, the kinetics of agonist-promoted internalization observed following stimulation of the rescued receptor was identical to that of the wild-type GnRHR [21^{**}], confirming that the mutant receptor has normal pharmacological and biochemical properties once it has been released from the ER. This contrasts with the report that $\Delta F508$ cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR; the most frequent mutant form of CFTR found in cystic fibrosis patients) has a significantly reduced half-life at the plasma membrane following its rescue with chemical chaperones when compared with that of wild-type CFTR [23,24]. Whether the difference is a reflection of the different nature of chemical versus pharmacological chaperones, or is protein-dependent, remains to be determined. Conn and collaborators then extended their study to show that ten additional non-peptidic GnRHR antagonists, belonging to three chemically distinct classes of compounds (indoles, quinolones and erythromycin-derived macrolides), all displayed pharmacological chaperone action on mutant GnRHRs [25^{**}]. Once again, the same set of mutations was rescued with all pharmacological chaperones tested. In addition, the efficacy of the rescue was proportional to the binding affinity of the different ligands [25^{**}], further stressing the link between the binding energy and the pharmacological chaperone action of the ligands.

In the two cases discussed so far, pharmacological chaperones rescued the function of ER-retained and readily degraded GPCR mutants. In the case of another GPCR, rhodopsin, pharmacological treatment was found to prevent the cytotoxic aggregation that results from the most common mutation (P23H-rhodopsin) associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa [26,27]. For this

mutant form of rhodopsin, which causes loss of peripheral and night vision as a result of retinal degeneration [28], treatment with retinoids, such as 9- or 11-cis-retinal [29] or a 7-membered ring variant of the natural ligand 11-cis-retinal (11-cis-7-ring-retinal) [30^{**}], restored the synthesis, cell surface expression and function of the mutant photo-receptor. Although the precise mechanism of action of the retinal variants has not been fully characterized, a pharmacological chaperone mode of action is likely.

Pharmacological chaperones can act on wild-type receptors

Although pharmacological chaperones have been described mainly in the context of mutant proteins, their action has also been reported for a few wild-type GPCRs. For example, the wild-type δ -opioid receptor is inefficiently processed, with less than 40% of the synthesized receptors reaching the mature form and being targeted to the plasma membrane under basal conditions [31]. Treatment with non-peptidic selective opioid ligands (Table 2) significantly increased the maturation efficacy, leading to the complete maturation and cell surface targeting of almost 100% of the produced receptors [18^{**}]. This effect could not be attributed to the stabilization of the receptor at the cell surface, as peptidic ligands, which cannot penetrate the plasma membrane, were without effect on receptor processing. In this study, both δ -opioid agonists and antagonists were found to act as pharmacological chaperones, indicating that the binding properties of the ligands rather than their signaling efficacy underlie their action. Pharmacological chaperone effects were also reported for the wild-type GnRHR. Indeed, in addition to rescuing the natural mutant form of GnRHR, the antagonist IN3 was also found to enhance cell surface expression of the wild-type receptor [21^{**}].

The fact that the maturation efficacy of wild-type GPCRs can be manipulated by pharmacological treatments opens the door to the use of pharmacological chaperones as regulators of tissue responsiveness in normal individuals. In the case of the δ -opioid receptor, this could have important implications in the design of anti-nociceptive drugs. However, whether inefficient maturation and its regulation by pharmacological chaperones will be limited to a few receptors, or represents a general trait of GPCRs, remains to be investigated.

Mechanistic features of pharmacological chaperones

The emerging hypothesis for the action of pharmacological chaperones suggests that selective lipophilic ligands can penetrate the plasma and ER membranes to bind to the partially folded receptor early during biosynthesis. In this context, ligand binding might alter the thermodynamic equilibrium in favour of the correctly folded protein, increasing the likelihood of the protein escaping the

stringent ER quality control, and ultimately leading to an increase in the steady-state level of functional receptors at the cell surface. This hypothesis is consistent with the observation that there is a clear correlation between the magnitude of ligand-mediated rescue and the binding affinity of ligands that mediate the effects. Such 'built-in' specificity of action for the targeted receptor presents the advantage of not having a general inhibitory effect on the quality control system, with the undesirable effects that this could cause. Pharmacological chaperone action should be distinguished from the cell surface stabilizing effects reported for some GPCR antagonists, which are believed to act by binding to receptors at the plasma membrane and preventing their spontaneous endocytosis and/or downregulation. Indeed, pharmacological chaperones need to act intracellularly during the biosynthesis of the receptors and, in contrast to cell surface stabilization effects, cannot be mimicked by cell impermeable peptidic ligands. The difference between the two mechanisms of action is further emphasized by the fact that both agonists and antagonists can act as pharmacological chaperones, whereas only antagonists can prevent the spontaneous endocytosis and downregulation processes.

When considering their action as clinically relevant pharmacological chaperones, both agonists and antagonists could have drawbacks. For agonists, their ability to promote receptor folding and cell surface targeting can be countered by their propensity to promote rapid receptor endocytosis and downregulation, two phenomena that could greatly reduce their efficacy. For antagonists, high affinity binding to the receptor that persists for long periods of time once the receptor has reached the cell surface could prevent the binding of the natural hormone, thus inhibiting receptor action and defeating the purpose of rescuing the cell surface expression. The most appropriate drug candidates for the clinical use of pharmacological chaperones would therefore be either antagonists with moderate affinities or partial agonists that have little propensity to cause endocytosis or downregulation.

Conclusions

Pharmacological chaperones represent a promising avenue for the treatment of conformational diseases, such as familial hypocalciuric hypercalcemia, hirschsprung disease, hypogonadotropic hypogonadism, hypothyroidism, neonatal hyperparathyroidism, NDI, obesity and retinitis pigmentosa (see Table 1), that result from GPCR misfolding. Although proof-of-principle for their action has been obtained for only three of these GPCR-related diseases, the apparent generality of the concept, even for wild-type receptors, will certainly lead to other examples in the near future. Whether such an approach will have general clinical implications for conformational diseases remains to be investigated, and the answer will need to wait for the results of clinical trials that are currently being conducted with pharmacological chaperones.

Acknowledgements

We are grateful to Dr Monique Lagacé for critical reading of the manuscript.

References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the annual period of review, have been highlighted as:

- of special interest
 - of outstanding interest
1. Kopito RR, Ron D: **Conformational disease**. *Nat Cell Biol* 2000, 2:E207-E209.
 2. Carrell RW, Lomas DA: **Conformational disease**. *Lancet* 1997, 350:134-138.
 3. Sitia R, Braakman I: **Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory**. *Nature* 2003, 426:891-894.
 4. Selkoe DJ: **Folding proteins in fatal ways**. *Nature* 2003, 426:900-904.
 5. Bernier V, Lagace M, Bichet DG, Bouvier M: **Pharmacological chaperones: potential treatment for conformational diseases**. *Trends Endocrinol Metab* 2004, 15:222-228.
 6. Conn PM, Leanos-Miranda A, Janovick JA: **Protein origami: therapeutics rescue of misfolded gene products**. *Molecular Interventions* 2002, 2:308-316.
 7. Perlmutter DH: **Chemical chaperones: a pharmacological strategy for disorders of protein folding and trafficking**. *Pediatr Res* 2002, 52:832-836.
 8. Morello JP, Bichet DG: **Nephrogenic diabetes insipidus**. *Annu Rev Physiol* 2001, 63:607-630.
 9. Ala Y, Morin D, Mouillac B, Sabatier N, Vargas R, Cotte, Dechaux M, Antignac C, Arthus MF, Lonergan M *et al.*: **Functional studies of twelve mutant V2 vasopressin receptors related to nephrogenic diabetes insipidus: molecular basis of a mild clinical phenotype**. *J Am Soc Nephrol* 1998, 9:1861-1872.
 10. Sadeghi HM, Innamorati G, Birnbaumer M: **An X-linked NDI mutation reveals a requirement for cell surface V2R expression**. *Mol Endocrinol* 1997, 11:706-713.
 11. Tsukaguchi H, Matsubara H, Taketani S, Mori Y, Seido T, Inada M: **Binding-, intracellular transport-, and biosynthesis-defective mutants of vasopressin type 2 receptor in patients with X-linked nephrogenic diabetes insipidus**. *J Clin Invest* 1995, 96:2043-2050.
 12. Schoneberg T, Yun J, Wenkert D, Wess J: **Functional rescue of mutant V2 vasopressin receptors causing nephrogenic diabetes insipidus by a co-expressed receptor polypeptide**. *EMBO J* 1996, 15:1283-1291.
 13. Oksche A, Schulein R, Rutz C, Liebenhoff U, Dickson J, Muller H, Birnbaumer M, Rosenthal W: **Vasopressin V2 receptor mutants that cause X-linked nephrogenic diabetes insipidus: analysis of expression, processing, and function**. *Mol Pharmacol* 1996, 50:820-828.
 14. Brown CR, Hong-Brown LQ, Biwersi J, Verkman AS, Welch WJ: **Chemical chaperones correct the mutant phenotype of the delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein**. *Cell Stress Chaperones* 1996, 1:117-125.
 15. Sato S, Ward CL, Krouse ME, Wine JJ, Kopito RR: **Glycerol reverses the misfolding phenotype of the most common cystic fibrosis mutation**. *J Biol Chem* 1996, 271:635-638.
 16. Morello JP, Salahpour A, Laperriere A, Bernier V, Arthus MF, Lonergan M, Petaja-Repo U, Angers S, Morin D, Bichet DG, Bouvier M: **Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants**. *J Clin Invest* 2000, 105:887-895.
 17. Bernier V, Lagace M, Lonergan M, Arthus MF, Bichet DG, Bouvier M: **Functional rescue of the constitutively internalized V2 vasopressin receptor mutant R137H by the pharmacological chaperone action of SR49059**. *Mol Endocrinol* 2004, 18:2074-2084.

18. Petaja-Repo UE, Hogue M, Bhalla S, Laperriere A, Morello JP, ●● Bouvier M: **Ligands act as pharmacological chaperones and increase the efficiency of delta opioid receptor maturation.** *EMBO J* 2002, **21**:1628-1637.

This is the first demonstration that pharmacological chaperones can increase the maturation efficacy of wild-type GPCRs using the δ -opioid receptor as a model. It also shows that both antagonists and agonists can act as pharmacological chaperones.

19. Morello JP, Salahpour A, Petaja-Repo UE, Laperriere A, Lonergan M, Arthus MF, Nabi IR, Bichet DG, Bouvier M: **Association of calnexin with wild type and mutant AVPR2 that causes nephrogenic diabetes insipidus.** *Biochemistry* 2001, **40**:6766-6775.
 20. Ulloa-Aguirre A, Janovick JA, Leanos-Miranda A, Conn PM: **Misrouted cell surface receptors as a novel disease aetiology and potential therapeutic target: the case of hypogonadotropic hypogonadism due to gonadotropin-releasing hormone resistance.** *Expert Opin Ther Targets* 2003, **7**:175-185.
 21. Janovick JA, Maya-Nunez G, Conn PM: **Rescue of ●● hypogonadotropic hypogonadism-causing and manufactured GnRH receptor mutants by a specific protein-folding template: misrouted proteins as a novel disease etiology and therapeutic target.** *J Clin Endocrinol Metab* 2002, **87**:3255-3262.
- This study generalized the concept of pharmacological chaperones. It showed that treatment with selective GnRHR antagonists rescued surface expression and function of GnRHR mutants linked to the development of hypogonadotropic hypogonadism. It also demonstrated that the rescued receptors had normal pharmacological and biochemical properties.
22. Leanos-Miranda A, Janovick JA, Conn PM: **Receptor-misrouting: an unexpectedly prevalent and rescuable etiology in gonadotropin-releasing hormone receptor-mediated hypogonadotropic hypogonadism.** *J Clin Endocrinol Metab* 2002, **87**:4825-4828.
 23. Gelman MS, Kopito RR: **Rescuing protein conformation: prospects for pharmacological therapy in cystic fibrosis.** *J Clin Invest* 2002, **110**:1591-1597.
 24. Sharma M, Pampinella F, Nemes C, Benharouga M, So J, Du K, Bache KG, Papsin B, Zerangue N, Stenmark H, Lukacs GL:

Misfolding diverts CFTR from recycling to degradation: quality control at early endosomes. *J Cell Biol* 2004, **164**:923-933.

25. Janovick JA, Goulet M, Bush E, Greer J, Wettlaufer DG, Conn PM: ● **Structure-activity relations of successful pharmacologic chaperones for rescue of naturally occurring and manufactured mutants of the gonadotropin-releasing hormone receptor.** *J Pharmacol Exp Ther* 2003, **305**:608-614.
- This study demonstrated that GnRHR antagonists belonging to different chemical classes can all act as pharmacological chaperones for the GnRHR. This confirmed that the binding affinity of the ligands to the receptor, rather than other specific chemical properties, determines the pharmacological chaperone action.
26. Saliba RS, Munro PM, Luthert PJ, Cheetham ME: **The cellular fate of mutant rhodopsin: quality control, degradation and aggresome formation.** *J Cell Sci* 2002, **115**:2907-2918.
 27. Illing ME, Rajan RS, Bence NF, Kopito RR: **A rhodopsin mutant linked to autosomal dominant retinitis pigmentosa is prone to aggregate and interacts with the ubiquitin proteasome system.** *J Biol Chem* 2002, **277**:34150-34160.
 28. Rattner A, Sun H, Nathans J: **Molecular genetics of human retinal disease.** *Annu Rev Genet* 1999, **33**:89-131.
 29. Noorwez SM, Malhotra R, McDowell JH, Smith KA, Krebs MP, Kaushal S: **Retinoids assist the cellular folding of the autosomal dominant retinitis pigmentosa opsin mutant P23H.** *J Biol Chem* 2004, **279**:16278-16284.
 30. Noorwez SM, Kuksa V, Imanishi Y, Zhu L, Filippek S, Palczewski K, ●● Kaushal S: **Pharmacological chaperone-mediated *in vivo* folding and stabilization of the P23H-opsin mutant associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa.** *J Biol Chem* 2003, **278**:14442-14450.
- This study extended the concept of pharmacological chaperone to a non-hormonal GPCR, the visual pigment rhodopsin. It also showed that pharmacological chaperones can rescue the expression of a rhodopsin mutant that would otherwise form cytotoxic aggregates leading to retinitis pigmentosa.
31. Petaja-Repo UE, Hogue M, Laperriere A, Walker P, Bouvier M: **Export from the endoplasmic reticulum represents the limiting step in the maturation and cell surface expression of the human delta opioid receptor.** *J Biol Chem* 2000, **275**:13727-13736.

Objectifs

L'objectif général de cette thèse est de tester l'hypothèse que des ligands sélectifs puissent agir comme chaperons pharmacologiques sur des récepteurs V2 de la vasopressine mutants et élucider les mécanismes d'action de ces chaperons pharmacologiques.

Le premier objectif est de démontrer l'efficacité des chaperons pharmacologiques (SR121463 et VPA-985) à rattrapper des récepteurs V2 de la vasopressine mutants (L59P, del62-64, L83Q, Y128S, S167L, A294P, P322H, R337X) dans un système cellulaire. La récupération fonctionnelle est évaluée en observant leur expression des récepteurs à la surface cellulaire et leur fonction.

Le deuxième objectif est d'explorer le mécanisme d'action des chaperons pharmacologiques. Pour ce faire, nous avons testé l'effet d'un traitement avec un chaperon pharmacologique, le SR121463, sur les interactions entre un récepteur mutant portant la mutation W164S et différentes protéines impliquées dans le contrôle de qualité du réticulum endoplasmique, telles, l'ubiquitine, la calnexine et DRiP78.

Le troisième objectif est de tester un autre chaperon pharmacologique, le SR49059, dans un système cellulaire puis de confirmer l'effet thérapeutique de ce chaperon pharmacologique chez 5 patients atteints de diabète insipide néphrogénique présentant des mutations dans le gène du récepteur V2 de la vasopressine (del62-64, R137H (3 patients) et W164S).

Il a été démontré que la mutation R137H entraînait un phénotype de désensibilisation constitutive, différent des autres récepteurs mutants testés (rétention intracellulaire). Pourtant, 3 patients répondent bien au traitement avec un chaperon pharmacologique. Alors, le quatrième objectif est de démystifier le mécanisme d'action du chaperon pharmacologique SR49059 dans le réchappement des récepteurs V2 de la vasopressine portant la mutation R137H.

Résultats

6.1 Premier article

Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptors mutants

Jean-Pierre Morello, Ali Salahpour, André Laperrière, Virginie Bernier,
Marie-Françoise Arthus, Michèle Lonergan, Ulla Petäjä-Repo, Stéphane Angers,
Denis Morin, Daniel G. Bichet et Michel Bouvier

Publié dans Journal of Clinical Investigation

Avril 2000, 105(7), p.887-895

L'article intitulé "Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptors mutants" démontre que des antagonistes non-peptidiques du récepteur de la vasopressine peuvent agir comme chaperons pharmacologiques en rattrapant l'expression à la surface cellulaire et la fonction de récepteurs V2 mutants responsable du diabète insipide néphrogénique.

Dans cet article, nous avons d'abord présenté que plusieurs récepteurs V2 mutants (L59P, del 61-64, L83Q, Y128S, S167L, A294P, P322H, R337X) sont retenus dans le réticulum endoplasmique. En effet, par des expériences de microscopie d'immunofluorescence, ces récepteurs mutants sont colocalisés avec la calréticuline, une protéine résidante du réticulum endoplasmique. Ensuite, nous avons démontré qu'un traitement avec des chaperons pharmacologiques (SR121463 et VPA-985) permet l'expression à la surface cellulaire de ces récepteurs mutants. De même, cette augmentation de l'expression à la membrane plasmique est accompagnée par une meilleure maturation des récepteurs mutants, indiqué par l'apparition de la forme complètement glycosylée du récepteur. En plus, un antagoniste peptidique des récepteurs de la vasopressine, ne pouvant pénétrer la membrane, ne peut ni mimer ni bloquer l'effet des chaperons pharmacologiques. Ces résultats suggèrent que les chaperons pharmacologiques agiraient au niveau du réticulum endoplasmique probablement en stabilisant une conformation du récepteur capable de passer les contrôles de qualité. De plus, une fois à la surface cellulaire, ces récepteurs mutants sont fonctionnels tel que évalué par leur capacité à signaler par la protéine $G\alpha_s$, ce qui entraîne une accumulation d'AMP cyclique.

Nous avons donc conclu que ces chaperons pharmacologiques pourraient agir en stabilisant une conformation du récepteur qui peut maintenant passer les systèmes de contrôle de qualité du réticulum endoplasmique. De plus, nous avons suggéré une certaine généralité du concept puisqu'autant le SR121463 que le VPA-985 ont réchappés des récepteurs V2 portant des mutations différentes.

Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants

Jean-Pierre Morello,^{1,2,3} Ali Salahpour,¹ André Laperrière,¹ Virginie Bernier,^{1,2,3} Marie-Françoise Arthus,^{2,3} Michèle Lonergan,^{2,3} Ulla Petäjä-Repo,¹ Stéphane Angers,¹ Denis Morin,^{2,3} Daniel G. Bichet,^{2,3} and Michel Bouvier^{1,2,3}

¹Département de Biochimie and Le Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome, Université de Montréal, Montréal, Quebec H3C 3J7, Canada

²Unité de Recherche Clinique, Centre de Recherche et Service de Néphrologie, Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal, Montréal, Quebec H4J 1C5, Canada

³Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Quebec H3C 3J7, Canada

Address correspondence to: Michel Bouvier, Université de Montréal, Département de Biochimie, PO Box 6128, Downtown Station, Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada.

Phone: (514) 343-6372; Fax: (514) 343-2210; [REDACTED]

Received for publication October 15, 1999, and accepted in revised form February 8, 2000.

Over 150 mutations within the coding sequence of the V2 vasopressin receptor (V2R) gene are known to cause nephrogenic diabetes insipidus (NDI). A large number of these mutant receptors fail to fold properly and therefore are not routed to the cell surface. Here we show that selective, nonpeptidic V2R antagonists dramatically increase cell-surface expression and rescue the function of 8 mutant NDI-V2Rs by promoting their proper folding and maturation. A cell-impermeant V2R antagonist could not mimic these effects and was unable to block the rescue mediated by a permeant agent, indicating that the nonpeptidic antagonists act intracellularly, presumably by binding to and stabilizing partially folded mutants. In addition to opening new therapeutic avenues for NDI patients, these data demonstrate that by binding to newly synthesized mutant receptors, small ligands can act as pharmacological chaperones, promoting the proper folding and maturation of receptors and their targeting to the cell surface.

J. Clin. Invest. 105:887–895 (2000).

Introduction

Arginine vasopressin (AVP), also known as the antidiuretic hormone, is a nonapeptide hormone that is secreted by the posterior pituitary in response to low urine osmolality or reduced blood pressure. In the collecting duct of the kidney, it promotes water reabsorption and concentration of the urine by binding to the V2 vasopressin receptor (V2R), a member of the G protein-coupled receptor (GPCR) superfamily (1). Upon hormone binding, the V2R will promote cAMP production, protein kinase A activation, and the recruitment of aquaporin-2 water channels to the apical membrane of the principal cell. It is this final step in the antidiuresis-signaling pathway that leads to increased water permeability.

Patients suffering from congenital nephrogenic diabetes insipidus (NDI) cannot concentrate their urine, even in the presence of elevated circulating levels of AVP, as a result of defects in the V2R signal transduction pathway described above (2). To date, 155 mutations within the V2R gene have been associated with the X-linked form of this disease in 239 families. In several instances the outcome of the mutation is easily predicted. For example, the presence of premature stop codons or frame shifts leading to severely truncated or altered receptor proteins would certainly not encode a

functional protein (3). However, on the basis of the structure-function relationship described for other GPCRs, the disabling effects of a number of more subtle mutations cannot be deduced. In an attempt to characterize the functional defects resulting from these mutations, heterologous expression systems have been used. Among the mutations tested, over 90% were found to lead to intracellular retention of the synthesized protein (4–9).

Inherited mutations leading to incompletely folded proteins that are retained intracellularly by the endoplasmic reticulum (ER) quality control system is a recurring observation (10–14). In some cases, it was found that the retention of the protein, and not an alteration of its functional properties, is responsible for the disease. For cystic fibrosis, it was shown that the $\Delta F508$ mutant of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) could form functional cAMP-activated chloride channels when it could escape the ER and be expressed at the cell surface (15, 16). Given the number of subtle missense mutations identified in the V2R, it could be envisaged that promoting the release of some mutant receptors from the ER is sufficient to recover function.

Because small molecules have been shown previously to influence the folding and organelle targeting of

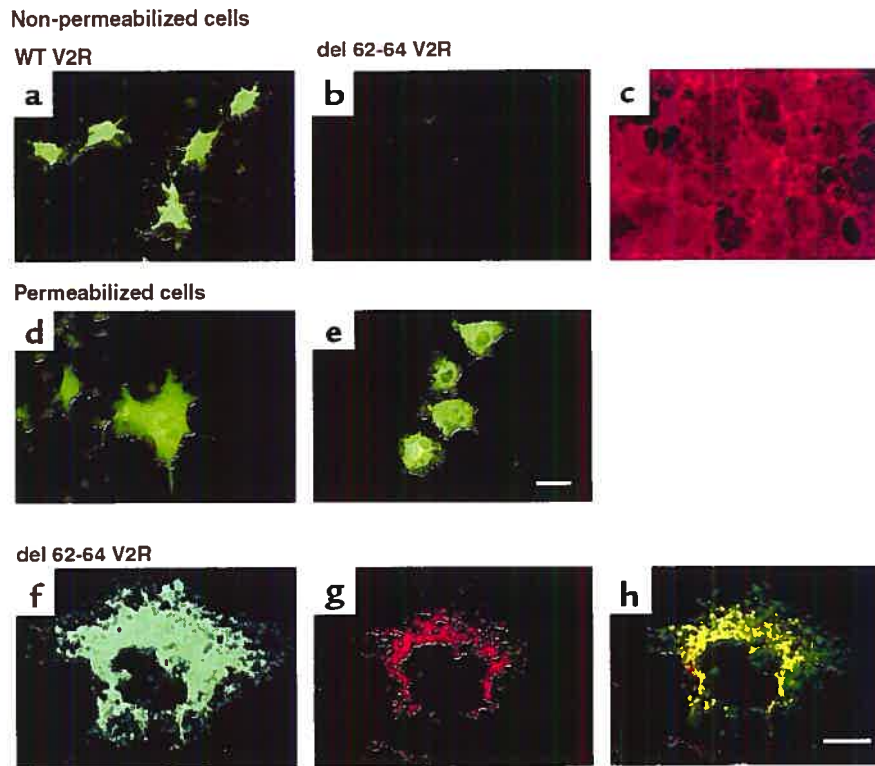


Figure 1

The del 62-64 V2R mutant is not expressed at the cell surface and is retained in the ER. (a and b) Nonpermeabilized cell immunofluorescence microscopy of COS-1 cells expressing the myc-tagged wild-type (WT) or myc-tagged del 62-64 V2R, respectively. (c) The same field of cells as in b stained with rhodamine-conjugated phalloidin to label actin filaments. (d and e) Permeabilized cell immunofluorescence microscopy of COS-1 cells expressing the myc-tagged WT or myc-tagged del 62-64 V2R, respectively. Bar = 50 μm . (f-h) Confocal immunofluorescence microscopy on permeabilized COS-1 cells expressing the myc-tagged del 62-64 V2R using the anti-myc antibody (f), an antibody directed against the ER-resident protein calreticulin (g). (h) Illustration of the superimposed localization of both proteins. Bar = 20 μm . Representative of 5 separate experiments.

proteins (17–20), we examined if treatment with small, cell-permeant V2R antagonists (21, 22) could stabilize mutant receptors so as to allow their maturation and cell surface expression.

Methods

Cell culture. COS-1 cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS (Immunocorp Sciences Inc., Montreal, Quebec, Canada), 100 U/mL⁻¹ penicillin/streptomycin, 125 μg amphotericin B, 125 μg sodium desoxycholate, 2 mM L-glutamine (all from Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada). Transient transfection of COS cells was performed using the DEAE-dextran method (23), and the cells were allowed to express the foreign DNA 48 hours before performing experiments.

HEK-293 cells were rendered stable for the expression of wild-type or del 62-64 V2R by transfection with 15 μg of receptor plasmid and 1 μg of pSV2neo (Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, California, USA). Single isolate clones were grown and maintained in supplemented DMEM containing 300 μg /mL⁻¹. Geneticin (Life Technologies).

Pretreatment of cells with the nonpeptidic V2R antagonists SR121463A and VPA-985 (generous gifts from C. Serradeil-LeGal [of Sanofi Research, 31036 Toulouse Cedex, France] and W. Spinelli [of Wyeth-Ayerst Research, Princeton, New Jersey USA], respectively) was performed for 16 hours or as indicated in the figure legends. The V2R antagonist (d(CH₂)₅¹,D-Tyr(Et)²,Val⁴,Arg⁸,des-Gly⁹)-vasopressin was purchased from BACHEM Bioscience Inc. (King of Prussia, Pennsylvania, USA).

Genomic DNA amplification and construction of wild-type and mutant V2R expression vectors. Genomic V2R DNA was amplified from NDI patients and unaffected related individuals using the PCR with a mutant 27-mer oligonucleotide primer bearing a *Kpn*I site (5'-CCCAGC-CCCAGGTACCTCATGTCC-3') and a mutant 22-mer oligonucleotide primer bearing a *Sal*I site (5'-GGATC-CAAGTCGACCCCTTGCC-3'), which hybridize in the 5' and 3' untranslated regions (UTR) of this gene, respectively. The PCR products were digested and subcloned 3' to the c-Myc epitope tag sequence (MEQKLISEEDLNA) into the pBC12BI mammalian expression vector (23).

Saturation binding and cAMP accumulation. Saturation binding isotherms were performed on attached cells

with increasing concentrations of [^3H]arginine vasopressin (NEN Life Sciences Products Inc., Boston, Massachusetts, USA) in the presence (to define nonspecific binding) and absence of an excess (10^{-5} M) of unlabeled AVP (Peninsula Laboratories Inc., Belmont, California, USA) as described previously (24). Total cAMP accumulation was measured by assessing the transformation of [^3H]ATP into [^3H]cAMP as described previously (25).

Metabolic labeling and immunoprecipitation. Stable HEK-293 cells expressing the wild-type or del 62-64 V2R were starved for 30 minutes in methionine-free DMEM, then labeled for 30 minutes with $150 \mu\text{Ci/mL}^{-1}$ [^{35}S]-Translabel (ICN Radiochemicals Inc., Irvine, California, USA) in the same medium. Cells were lysed by sonication and membranes were sedimented by centrifugation at $25,000 \text{ g}$ for 30 minutes. The crude membrane preparation was solubilized in 0.5% n -dodecyl- β -D-maltoside (Alexis Corp., San Diego, California, USA). The solubilized receptor was immunoprecipitated with an anti-myc agarose conjugate (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, USA), and, where indicated, the immunoprecipitated V2R was digested for 16 hours at 37°C with 4 mU endoglycosidase H (Endo H) or 40 mU peptide N-glycosidase F (PNGase F; Roche Molecular Biochemicals, Laval, Quebec, Canada). Immunopurified receptors were subsequently resolved on 12% SDS-PAGE, treated with En 3 Hance autoradiography enhancer (NEN Life Science Products), and exposed to Biomax film (Eastman Kodak Co. Scientific Imaging Systems, Rochester New York, USA) at -80°C .

Immunofluorescence microscopy and flow cytometry. To determine cell-surface receptor expression, cells were incubated with the 9E10 mAb (anti-myc; Santa Cruz Biotechnology Inc.) in DMEM/HEPES on ice for 1 hour. The cells were rinsed with DMEM/HEPES, followed by ice-cold PBS, and fixed with 3% paraformaldehyde (PFA). Nonspecific sites were quenched with a blocking buffer (PBS containing 0.2% BSA). After extensive rinsing, the cells were incubated with Oregon green-conjugated donkey anti-mouse antibody (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) in blocking buffer for 30 minutes in the dark. Labeling of actin filaments was performed with rhodamine-conjugated phalloidin (Molecular Probes). After extensive washing, the coverslips were mounted upside-down on glass microscope slides in Airvol (Air Products and Chemicals Inc., Allentown, Pennsylvania, USA) and viewed with a Zeiss Axioskop fluorescent microscope (Carl Zeiss Inc., Thornwood, New York, USA) equipped with $\times 40$ and $\times 100$ planapochromat objective lenses. For intracellular labeling, cells were first fixed with 3% PFA in PBS and incubated with 0.2% Triton X-100 for 10 minutes. The cells were treated with the 9E10 or anti-calreticulin antibody (StressGen Biotechnologies Corp., Victoria, British Columbia, Canada) in blocking buffer at room temperature for 30 minutes. Labeling with Oregon green-conjugated donkey anti-mouse antibody is as described above. Double labeling was

viewed on a Biorad MRC 600 laser confocal microscope (BioRad Laboratories Ltd., Mississauga, Ontario, Canada).

For flow cytometry, the cells were washed with PBS and incubated with 9E10 antibody in PBS for 1 hour at room temperature. After this incubation, the cells were washed with PBS and incubated with phycoerythrin-conjugated goat anti-mouse antibody (Immunotech, Westbrook, Maine, USA) in PBS for 1 hour at room temperature. The cells were washed with PBS, fixed with 3% paraformaldehyde, and analyzed on a FACS $^{\text{®}}$ calibur Becton-Dickson flow cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, California, USA) set up to detect phycoerythrin fluorescence ($585 \pm 21 \text{ nm}$); $10,000$ cells were analyzed for each sample.

Results

Intracellular retention of the del 62-64 V2R. Given that the first cytoplasmic loop of GPCR has never been implicated in ligand binding or G protein coupling, we re-

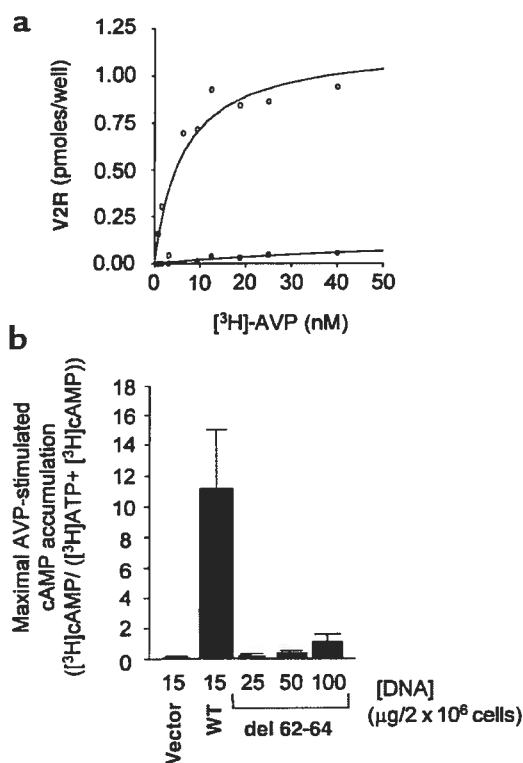


Figure 2

Cells expressing the del 62-64 V2R mutant do not display AVP-binding or signaling on whole cells. (a) Saturation-binding isotherm of [^3H]AVP to whole cells expressing the WT (open circles) and the del 62-64 V2R (filled circles). COS-1 cells were transfected with $15 \mu\text{g}$ of plasmid encoding either WT or del 62-64 V2R. Specific binding is expressed as picomoles per well of [^3H]AVP bound per well. Representative of 3 separate experiments. (b) Accumulation of cAMP in cells expressing WT or del 62-64 V2R. COS-1 cells were transfected with the indicated amounts of plasmid DNA. The data are expressed as an increase in cAMP levels above basal levels obtained at a 10^{-5} M AVP concentration and expressed as the mean \pm SEM ($n = 4$).

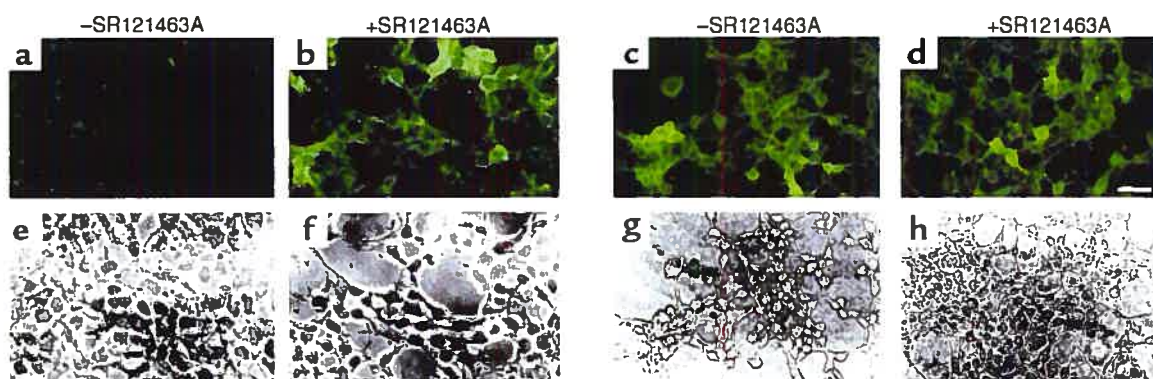


Figure 3

SR121463A treatment increases the presence of the del 62-64 V2R at the cell surface. Nonpermeabilized cell immunofluorescence microscopy of HEK-293 cells stably expressing the del 62-64 V2R that were incubated for 16 hours in the absence (a) or presence (b) of 10^{-5} M SR121463A. (c and d) Identical treatment as a and b performed on HEK-293 cells expressing the WT V2R. Bar = 50 μ m. (e-h) Same field of cells as a-d, viewed by phase-contrast microscopy. Representative of 3 separate experiments.

soned that a mutation in this domain could lead to a nonfunctional receptor as a consequence of ER retention. Therefore, the expression and functional characteristics of an NDI mutant V2R bearing a 3-amino acid deletion in the first cytoplasmic loop (del 62-64 V2R) was examined. Immunofluorescence analysis of non-permeabilized cells shows that in contrast to the wild-type receptor, the del 62-64 V2R was not expressed at the cell surface (Figure 1, a-c). However, upon cell permeabilization the del 62-64 V2R could be detected intracellularly (Figure 1, d and e), indicating that it was properly synthesized. Synthesis of the full-length receptor was further confirmed by Western blot analysis (data not shown). Higher magnification of permeabilized cells expressing del 62-64 V2R reveals a perinuclear punctate labeling that is characteristic of ER staining (Figure 1f). Colocalization with the ER-resi-

dent protein calreticulin confirms that the del 62-64 V2R is indeed retained intracellularly at the level of the ER (Figure 1, g and h). Consistent with this lack of cell-surface receptor immunoreactivity is the absence of [3 H]vasopressin binding (Figure 2a) and vasopressin-stimulated cAMP production (Figure 2b) in whole cells expressing the del 62-64 V2R.

Cell-surface targeting and functional rescue of the del 62-64 V2R upon antagonist treatment. As shown in Figure 3, treating cells with the selective, cell-permeant V2R antagonist SR121463A for 16 hours dramatically increased the cell-surface expression of the del 62-64 V2R (Figure 3, a and b), whereas it did not affect that of the wild-type receptor (Figure 3, c and d). In an effort to quantitate the effect of the treatment on cell-surface expression, flow cytometry analysis in the presence and absence of SR121463A was carried out. Increasing the

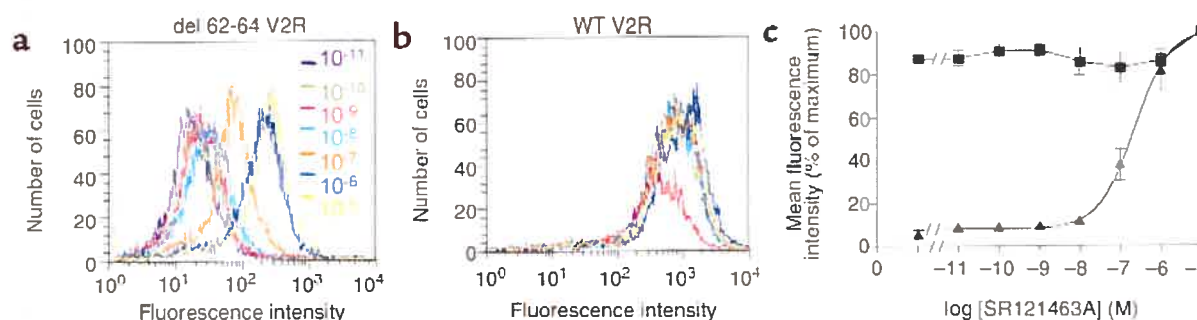


Figure 4

Concentration-dependent increase of cell-surface del 62-64 V2R after SR121463A treatment. Cell-surface receptor expression was measured by FACS of HEK-293 cells stably expressing either del 62-64 (a) or WT (b) V2R. Cells were treated with the indicated concentrations of SR121463A. Representative of 3 separate experiments. (c) Dose-dependent effect of SR121463A treatment on cell-surface del 62-64 (filled triangles) and WT (filled squares) V2R expression as quantified by the mean cell-surface fluorescence intensity obtained by FACS. The 100% point was taken from cells exposed to a 10^{-5} M concentration of SR121463A, and the 0% point was taken from cells incubated without anti-myc antibody. There was no difference in cell-surface fluorescence intensity between untransfected HEK-293 cells incubated with both antibodies and HEK-293 cells expressing the del 62-64 V2R that were incubated without anti-myc antibody. There was no difference in cell-surface fluorescence intensity between untransfected HEK-293 cells incubated with both antibodies and HEK-293 cells expressing the del 62-64 V2R that were incubated without anti-myc antibody. The data are expressed as means \pm SEM ($n = 3$).

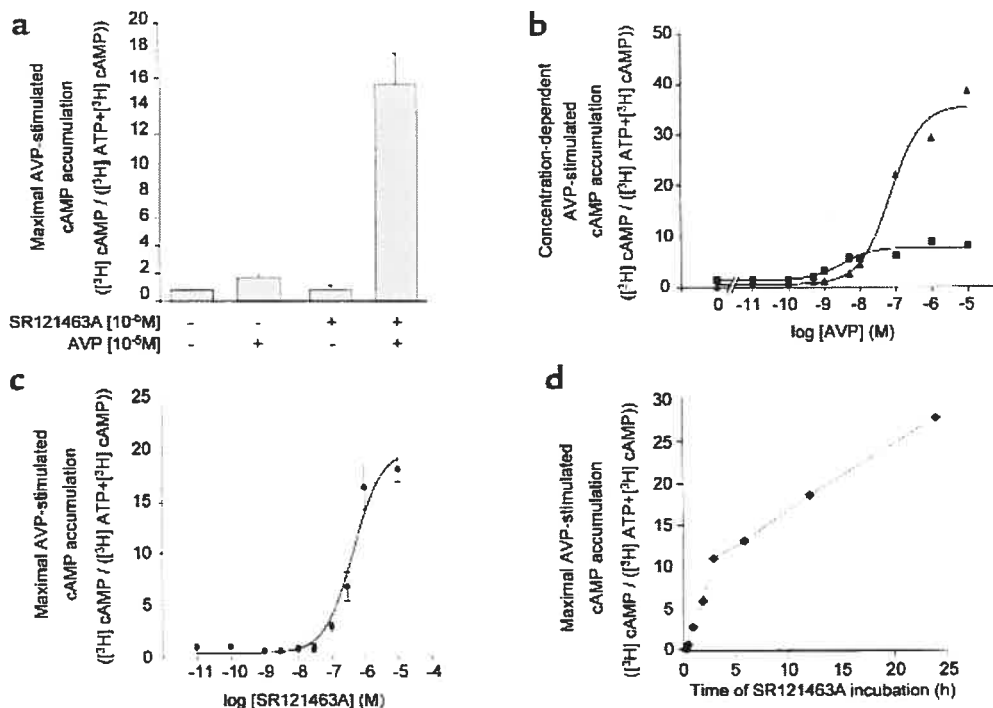


Figure 5

Rescued signaling activity of cells expressing the del 62-64 V2R after pretreatment with SR121463A. (a) AVP-stimulated cAMP accumulation was measured in whole HEK-293 cells stably expressing the del 62-64 V2R. Cells were treated (or not) with 10⁻⁵ M SR121463A for 16 hours, washed extensively, and incubated (or not) with 10⁻⁵ M AVP for 20 minutes. The data are expressed as means \pm SEM ($n = 3$). (b) Concentration-dependent AVP-stimulated cAMP accumulation was measured in whole COS-1 cells transiently expressing the del 62-64 V2R. Cells were treated with (filled triangles) or without (filled squares) 10⁻⁵ M SR121463A for 16 hours, washed extensively, and incubated with the indicated AVP concentrations. Representative of 3 separate experiments. (c) Dose-dependent effect of SR121463A on AVP-stimulated cAMP accumulation. HEK-293 cells stably expressing the del 62-64 V2R were treated for 16 hours with the indicated concentrations of SR121463A before the determination of cAMP accumulation. The data are expressed as means \pm SEM ($n = 4$). (d) Onset of the effect of SR121463A pretreatment on AVP-dependent cAMP accumulation. HEK-293 cells stably expressing the del 62-64 V2R were treated with 10⁻⁶ M SR121463A for the indicated times before assessing AVP-stimulated cAMP accumulation. Representative of 3 separate experiments.

concentration of SR121463A results in an increase of the cell-surface fluorescence intensity (Figure 4a) with a half-maximal effective concentration (EC₅₀) of 2.2×10^{-7} M (Figure 4c). It should be noted that the absolute mean fluorescence intensity observed after treatment of del 62-64 V2R-expressing cells with 10⁻⁵ M SR121463A was as high as 30% of that observed for the cells expressing the wild-type V2R. Interestingly, under the same conditions, vasopressin stimulation of del 62-64 V2R cells produced 30% of the cAMP accumulation obtained in cells expressing the wild-type V2R. This indicates that the mutant receptor is as efficiently coupled to the cyclase stimulation pathway as the wild-type V2R once it is expressed at the cell surface. The antagonist treatment did not affect the already maximal fluorescence intensity of cells expressing the wild-type V2R (Figure 4b).

The increase in cell-surface expression of the del 62-64 V2R promoted by SR121463A pretreatment led to the functional rescue of this mutant protein. Indeed, after removal of the antagonist, stimulation of the del 62-64 V2R with vasopressin promoted cAMP accumulation (Figure 5a) that was found to be concentration dependent (Figure 5b). This is in sharp contrast to what is observed in the absence of SR121463A pretreatment. As was the case for cell-surface expression, vasopressin responsiveness was restored in an SR121463A concentration-dependent manner (Figure 5c) with an EC₅₀ value similar for the 2 phenomena (4.6×10^{-7} vs 2.2×10^{-7} M). This functional rescue of the del 62-64 V2R is time dependent and could be observed as early as 1 hour after the addition of SR121463A to the cells (Figure 5d). In addition, the functional rescue observed in cells expressing the del 62-64 V2R lasted for at least 24 hours after the removal of antagonist (data not shown). Taken together, these data indicate that treatment with the cell-permeant antagonist permits the trafficking of receptor to the cell surface and that the major defect of the del 62-64 V2R is its inability to escape the ER in an appreciable quantity. Once at the plasma membrane, this mutant receptor is functional and can induce cAMP production in response to vasopressin stimulation.

Antagonist treatment promotes the proper maturation of the del 62-64 V2R. In an effort to further characterize the mechanism by which the antagonist promotes proper cell-surface targeting and rescues function of the del

Antagonist treatment promotes the proper maturation of the del 62-64 V2R. In an effort to further characterize the mechanism by which the antagonist promotes proper cell-surface targeting and rescues function of the del

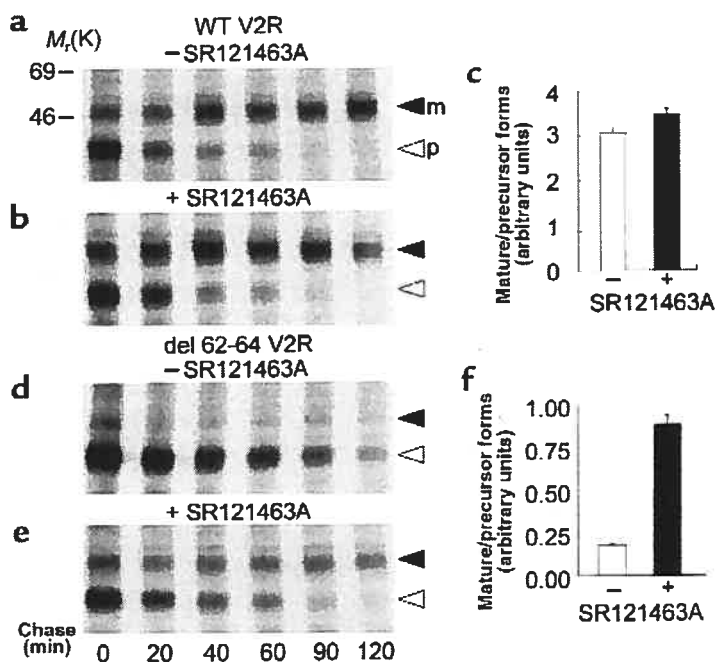


Figure 6

SR121463A treatment promotes del 62-64 V2R protein maturation. Metabolic labeling of the WT (a, b) and del 62-64 (d, e) V2R in HEK-293 cells incubated in the absence or presence of 10^{-5} M SR121463A for 16 hours. Labeling was carried out with $150 \mu\text{Ci/mL}^{-1}$ [^{35}S]methionine/cysteine for 30 minutes followed by the indicated times of chase in complete medium. The migration of the precursor (open arrowhead) and mature (filled arrowhead) species is indicated. Representative of 3 separate experiments. (c and f) Mature/precursor receptor ratio used as an index of the maturation efficiency was calculated at the 60-minute chase time by densitometric analysis of the autoradiograms.

62-64 V2R, pulse-chase metabolic labeling experiments were carried out. As shown in Figure 6, the V2R is synthesized as a 38-kDa precursor form that is processed to a mature 48-kDa species. In cells expressing the wild-type receptor, this maturation process is unaffected by the SR121463A treatment (Figure 6, a-c). In the absence of SR121463A, the del 62-64 V2R precursor is very poorly processed to the mature form and accumulates for longer periods of time before being degraded (half-life of over 3 hours compared with 30 minutes for the wild-type V2R precursor; Figure 6d). However, SR121463A treatment favored the maturation of the mutant receptor as evidenced by the appearance of the 48-kDa mature receptor form (Figure 6, e and f).

The nature of the precursor and mature forms of the receptor was confirmed by their sensitivity to Endo H and the peptide PNGase F enzymes. Indeed, once proteins mature past the medial saccule of Golgi complex, they become resistant to oligosaccharide digestion by Endo H but remain sensitive to the actions of PNGase F (26). In the absence of SR121463A treatment, the 38-kDa del 62-64 V2R species was found to be sensitive to both enzymes, as indicated by the increase in its electrophoretic mobility, confirming it as a core glycosylated precursor receptor (Figure 7a). In contrast, the 48-kDa form that accumulated upon SR121463A treatment acquired Endo H resistance, indicating the presence of complex carbohydrates characteristic of the mature receptor (Figure 7b). The absence of complete digestion by PNGase F reflects the presence of O-linked carbohydrates in the mature V2R (27).

The mature/precursor receptor protein ratio at the 60-minute chase time was then used as an index of the maturation process to determine the EC_{50} of SR121463A in

this assay. As seen in Figures 7, c and d, the EC_{50} for the effect of SR121463A on the maturation of del 62-64 V2R was found to be 4.3×10^{-7} M, a value comparable to those found for its effects on function and cell surface expression (4.6 and 2.2×10^{-7} M, respectively).

The results described above, and in particular the observation that the SR121463A treatment decreases the half-life of the del 62-64 V2R, suggest that the antagonist acts by binding to the intracellular precursor form to favor its proper folding. This concept is further supported by the observation that the cell-impermeant V2R antagonist ($\text{d}(\text{CH}_2)_5^1\text{,D-Tyr}(\text{Et})^2\text{,Val}^4\text{,Arg}^8\text{,des-Gly}^9\text{-vasopressin}$) (28) does not mimic the effect of SR121463A and, when used at concentrations that saturate cell-surface vasopressin receptors (10^{-5} M), did not interfere with the ability of SR121463A to promote cell-surface targeting of the del 62-64 V2R as assessed by flow cytometry analysis (Figure 8).

Several NDI mutant receptors can be functionally rescued. Of 15 mutants tested that showed little or no cell-surface receptor expression under control conditions, SR121463A treatment restored both cell-surface targeting and agonist-stimulated signaling for 8 of these (Figure 9). The variation in the extent of functional rescue as assessed by cAMP production (e.g., the poor functional recovery of R337X), may reflect the fact that, in addition to being retained intracellularly, some mutants may also be somewhat impaired in their ability to productively interact with Gs and stimulate adenylyl cyclase activity (4, 5). Interestingly, the same subset of mutant receptors that was rescued by SR121463A was also rescued by the another cell-permeant nonpeptidic V2R antagonist, VPA-985 (data not shown), suggesting that it is not a property that is unique to SR121463A.

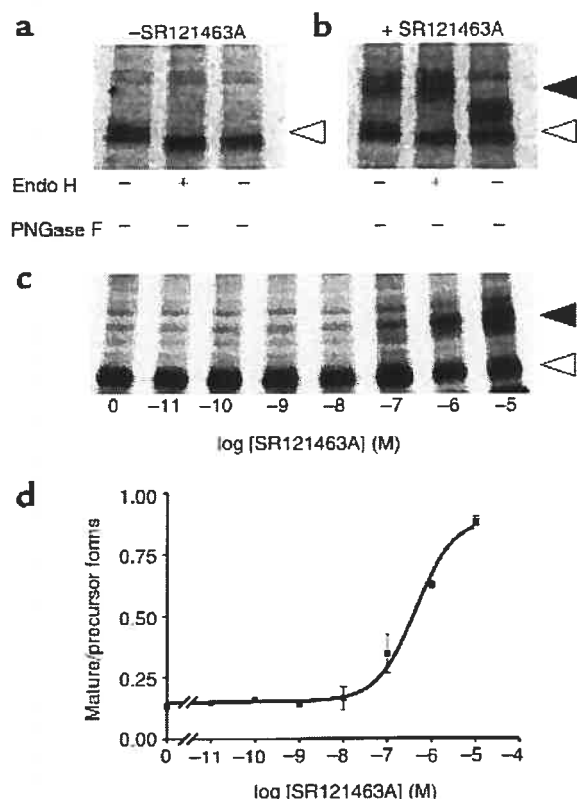


Figure 7
Sensitivity of the mature and precursor V2R species to Endo H and PNGase F. The nature of the del 62-64 V2R species was assessed in pulse-chase metabolic-labeling experiments carried out in cells treated (or not) with SR121463A. The glycosylation state was determined at the 60-minute chase time by treating the purified receptor with the indicated enzymes. In the absence of SR121463A treatment (a), only the precursor (open arrowhead) form that is sensitive to both enzymes is observed, whereas following a 10^{-5} -M SR121463A treatment for 16 hours (b), the Endo H-resistant mature species is observed (closed arrowhead). (c) Concentration dependence of the SR121463A-promoted maturation of the V2R. The effect of the indicated concentrations of SR121463A (for 16 hours) on the maturation of the del 62-64 V2R was assessed at the 60-minute chase time. (d) The mature/precursor receptor ratio of the autoradiogram shown in c was calculated by densitometric analysis of the autoradiogram. Representative of 3 separate experiments.

Discussion

Antagonists have been shown previously to stabilize GPCR into conformations that are more resistant to downregulation. For instance, treatment of cells expressing the histamine-H2 receptor with the antagonists cimetidine and ranitidine, lead to an increase of the receptor number (29). Such stabilization effects have been more apparent for constitutively active mutant receptors (30–32), which are known to be less stable than their wild-type counterparts. In these cases, it was assumed that the antagonists bind to the cell-surface receptors and stabilize a conformation that is less amenable to internalization and degradation. Following this reasoning, one could suggest that the effect

of SR121463A in promoting the accumulation of functional receptors at the cell surface could also be due to the stabilization of a small contingent of mutant receptors already expressed there. The data presented here do not support such a hypothesis. First, a peptide antagonist that does not penetrate the cell did not mimic nor block (even when used at 100-fold excess concentration) the functional rescue promoted by the SR121463A treatment. Second, the treatment with SR121463A caused a more rapid and efficient processing of the del 62-64 V2R as reflected by the reduction of the half-life of the precursor and the increase in the amount of mature receptor detected.

Taken together, these data allow us to propose a model in which small, nonpeptidic V2R antagonists permeate the cell and bind to incompletely folded mutant receptors. This would then stabilize a conformation of the receptor that allows its release from the ER quality control apparatus. The stabilized receptor would then be targeted to the cell surface where it could bind vasopressin and promote signal transduction. As such, these compounds would act as pharmacological chaperones that promote receptor processing through their specific binding activity. However, one cannot exclude the possibility that SR121463A could act as a chemical chaperone by an undefined mechanism.

The model proposed above is consistent with the finding that 2 NDI mutants that were found to be normally expressed at the cell surface in the absence of SR121463A but that are deficient in vasopressin-mediated cAMP production (D85N and V88M; ref. 33 and

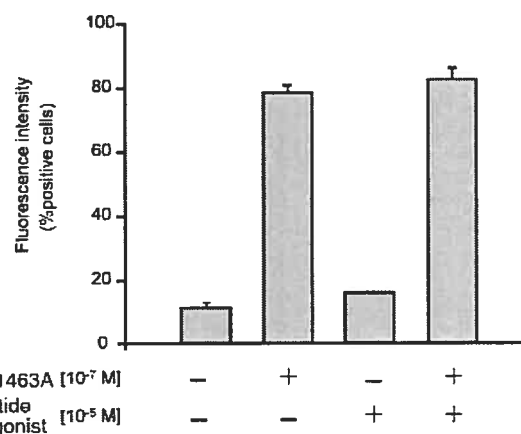


Figure 8
Intracellular mode of action of SR121463A on the rescue of cell-surface del 62-64 V2R. HEK-293 cells stably expressing the del 62-64 V2R were treated with or without 10^{-5} M of the peptidic antagonist d(CH₂)₅¹, D-Tyr(Et)², Val⁴, Arg⁸, des-Gly⁹-vasopressin for 1 hour before the addition of SR121463A. A concentration of 10^{-7} M of SR121463A was then added (or not) to the cells for 6 hours. To ensure that the peptidic antagonist did not become degraded during the incubation period it was added every hour. Cell-surface receptor expression was measured by FACS[®] as described above. Cells were scored as positive based on a 0% point taken without anti-myc antibody and without any drug treatments. The data are expressed as means \pm SEM ($n = 3$).

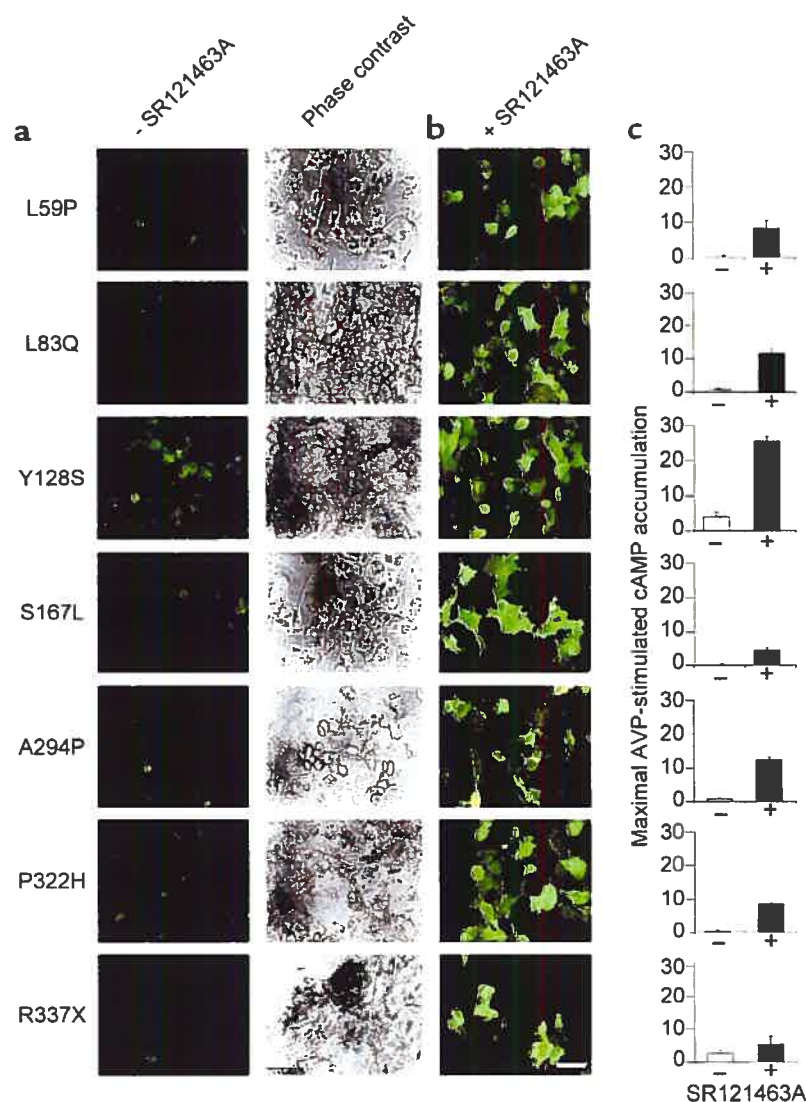


Figure 9 SR121463A increases the cell-surface expression and signaling activity of several distinct NDI-V2R mutants. (a) cos-1 cells transiently transfected with plasmids encoding the indicated *myc*-tagged mutant V2 receptors detected by whole-cell immunofluorescence and phase-contrast microscopy. All mutants were found to be poorly expressed at the cell surface. (b) Treatment with 10^{-5} M SR121463A for 16 hours leads to cell-surface appearance of these receptor mutants as assessed by fluorescence microscopy. Bar = 50 μ m. (c) Effects of a pretreatment with 10^{-5} M SR121463A for 16 hours on vasopressin-stimulated cAMP accumulation in cos-1 cells expressing the various mutants as indicated in a. The position and nature of the amino acid replacement in each NDI-causing mutation is indicated by the single letter amino acid code. X indicates a stop codon. Representative of 3 separate experiments.

ref. 8, respectively) could not be functionally rescued by the antagonist treatment (data not shown).

The observation that antagonist treatment rescues the function of NDI vasopressin receptor mutants by promoting their maturation and targeting to the plasma membrane may have important clinical implications because it could offer a new therapeutic avenue for the treatment of this disease. The potential for the use of nonpeptidic vasopressin antagonists in clinical settings is further supported by the fact that the functional rescue observed in cells expressing the del 62-64 V2R lasted for at least 24 hours after the removal of the antagonists (data not shown). Therefore, antagonist

treatment could offer a simple alternative to the gene therapy approach that was proposed recently (34). Whether or not a nonpeptidic agonist could also promote rescue of the receptor is an interesting possibility that remains to be investigated.

It has been argued that, in contrast to cystic fibrosis where the majority of patients share a unique mutation (Δ F508) that leads to ER retention, the diversity of mutations (over 150 mutations) in NDI complicates the search for rescue strategies of intracellularly retained mutant proteins (35). The results presented in this study challenge this notion because 8 distinct mutations could be rescued by the same treatment.

Stabilization of protein conformation(s) that are compatible with their export from the ER using small, cell-permeable ligands may represent a generally applicable rescue strategy. The generality of this approach is further supported by the observation that at least 2 different nonpeptidic V2R antagonists, SR121463A and VPA-985, rescued the same V2R mutants. Given that many pathologies stem from intracellular retention of otherwise functional proteins (for a review see ref. 36), this mechanism may offer a new therapeutic approach to the treatment of several different diseases resulting from errors in protein kinesin.

Acknowledgments

We thank C. Serradeil-LeGal and W. Spinelli for the generous gifts of SR121463A and VPA-985, respectively; I. Robert Nabi for antisera and his help in immunofluorescence experiments; L. Cournoyer and S. Sénéchal for their technical assistance; M. Moreau for assistance with the figures; H. Ansanay, R. Qanbar, T.E. Hebert, and S. Michnick for helpful discussions and critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Kidney Foundation of Canada and the Medical Research Council of Canada (MRC) to M. Bouvier and D.G. Bichet. D.G. Bichet thanks la Fondation J. Rodolphe-La Haye for generous support. J.P. Morello held a studentship from the Heart and Stroke Foundation of Canada. A. Salahpour and S. Angers hold studentships from the MRC. M. Bouvier holds an MRC Scientist Award.

1. Knoers, N.V., and Monnens, L.L. 1999. Nephrogenic diabetes insipidus. *Semin. Nephrol.* 19:344-352.
2. Bichet, D.G., and Fujiwara, T.M. 2000. Nephrogenic diabetes insipidus. In *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. 8th edition. C.R. Scriver et al., editors. McGraw-Hill. New York, NY. In press.
3. Schüle, R., Rutz, C., and Rosenthal, W. 1996. Membrane targeting and determination of transmembrane topology of the human vasopressin V2 receptor. *J. Biol. Chem.* 271:28844-28852.
4. Wenkert, D., et al. 1996. Functional characterization of five V2 vasopressin receptor gene mutations. *Mol. Cell. Endocrinol.* 124:43-50.
5. Sadeghi, H.M., Innamori, G., and Birnbaumer, M. 1997. An X-linked NDI mutation reveals a requirement for cell surface V2R expression. *Mol. Endocrinol.* 11:706-713.
6. Tsukaguchi, H., et al. 1995. Binding, intracellular transport, and biosynthesis-defective mutants of vasopressin type 2 receptor in patients with X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *J. Clin. Invest.* 96:2043-2050.
7. Schöneberg, T., Yun, J., Wenkert, D., and Wess, J. 1996. Functional rescue of mutant V2 vasopressin receptors causing nephrogenic diabetes insipidus by a co-expressed receptor polypeptide. *EMBO J.* 15:1283-1291.
8. Ala, Y., et al. 1998. Functional studies of twelve mutant V2 vasopressin receptors related to nephrogenic diabetes insipidus: molecular basis of a mild clinical phenotype. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9:1861-1872.
9. Oksche, A., et al. 1996. Vasopressin V2 receptor mutants that cause X-linked nephrogenic diabetes insipidus: analysis of expression, processing, and function. *Mol. Pharmacol.* 50:820-828.
10. Cheng, S.H., et al. 1990. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell.* 63:827-834.
11. Lehrman, M.A., et al. 1986. The Lebanese allele at the low density lipoprotein receptor locus. Nonsense mutation produces truncated receptor that is retained in endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 262:401-410.
12. Gow, A., Friedrich, V.L., and Lazzarini, R.A. 1994. Many naturally occurring mutations of myelin proteolipid protein impair its intracellular transport. *J. Neurosci. Res.* 37:574-583.
13. Singh, N., et al. 1997. Prion protein aggregation reverted by low temperature in transfected cells carrying a prion protein gene mutation. *J. Biol. Chem.* 272:28461-28470.
14. Hou, W.-S., et al. 1999. Characterization of novel cathepsin K mutations in the pro and mature polypeptide regions causing pycnodysostosis. *J. Clin. Invest.* 103:731-738.
15. Dalemans, W., et al. 1991. Altered chloride ion channel kinetics associated with the $\Delta F508$ cystic fibrosis mutation. *Nature.* 354:526-528.
16. Drumm, M.L., et al. 1991. Chloride conductance expressed by $\Delta F508$ and other mutant CFTRs in *Xenopus* oocytes. *Science.* 254:1797-1799.
17. Eilers, M., and Schatz, G. 1986. Methotrexate strongly inhibits DHFR import into yeast mitochondria. *Nature.* 322:228-232.
18. Loo, T.P., and Clarke, D.M. 1997. Correction of defective protein kinesin of human P-glycoprotein mutants by substrates and modulators. *J. Biol. Chem.* 272:709-712.
19. Wang, J., and White, A.L. 1999. 6-aminoheptanoic acid as a chemical chaperone for apolipoprotein (a). *J. Biol. Chem.* 274:12883-12889.
20. Tamarappoo, B.K., and Verkman, A.S. 1998. Defective aquaporin-2 trafficking in nephrogenic diabetes insipidus and correction by chemical chaperones. *J. Clin. Invest.* 101:2257-2267.
21. Serradeil-LeGal, C., et al. 1996. Characterization of SR121463A, a highly potent and selective, orally active vasopressin V2 receptor antagonist. *J. Clin. Invest.* 98:2729-2738.
22. Albright, J.D., et al. 1998. 5-Fluoro-2-methyl-N-[4-(5H-pyrrolo[2,1-c]-[1,4]benzodiazepin-10(11H)-carbonyl)-3-chlorophenyl]benzamide (VPA-985): an orally active arginine vasopressin antagonist with selectivity for V2 receptors. *J. Med. Chem.* 41:2442-2444.
23. Cullen, B.R. 1987. Use of eucaryotic expression technology in the functional analysis of cloned genes. *Methods Enzymol.* 152:684-704.
24. Morin, D., et al. 1998. The D136A mutation of the V2 vasopressin receptor induces a constitutive activity which permits discrimination between antagonists with partial agonist and inverse agonist activities. *FEBS Lett.* 441:470-475.
25. Wong, Y.H., et al. 1990. Mutant α subunits of G_{12} inhibit cAMP accumulation. *Nature.* 351:63-65.
26. Kornfeld, R., and Kornfeld, S. 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* 54:631-664.
27. Sadeghi, H., and Birnbaumer, M. 1999. O-glycosylation of the V2 vasopressin receptor. *Glycobiology.* 9:731-737.
28. Jard, S., et al. 1986. Vasopressin antagonists allow demonstration of a novel type of vasopressin receptor in the rat adenohypophysis. *Mol. Pharmacol.* 30:171-177.
29. Smit, M., et al. 1996. Inverse agonism of histamine H_2 antagonists accounts for upregulation of spontaneously active histamine H_2 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:6802-6807.
30. Gether, U., et al. 1997. Structural instability of a constitutively active G protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* 272:2587-2590.
31. Heinfinkel, M., et al. 1995. A constitutively active mutant thyrotropin-releasing hormone receptor is chronically down-regulated in pituitary cells: evidence using chlordiazepoxide as a negative antagonist. *Mol. Endocrinol.* 9:1455-1460.
32. Lee, T.W., Cotecchia, S., and Milligan, G. 1997. Up-regulation of the levels of expression and function of a constitutively active mutant of the hamster α_1 -adrenoceptor by ligands that act as inverse agonists. *Biochem. J.* 325:733-739.
33. Sadeghi, H., et al. 1997. Biochemical basis of partial nephrogenic diabetes insipidus phenotypes. *Mol. Endocrinol.* 11:1806-1813.
34. Schöneberg, T., et al. 1997. Reconstitution of mutant V2 vasopressin receptors by adenovirus-mediated gene transfer. *J. Clin. Invest.* 100:1547-1556.
35. Oksche, A., and Rosenthal, W. 1998. The molecular basis of nephrogenic diabetes insipidus. *J. Mol. Med.* 76:326-337.
36. Welch, W.J., and Brown, C.R. 1996. Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding. *Cell Stress Chaperones.* 1:109-115.

6.2 Deuxième article

Probing the ER site of action of the pharmacological chaperone SR121463 reveals a role for DRiP78 upstream of calnexin in the folding of the V2 vasopressin receptor

Virginie Bernier, Stéphanie M. Pontier, Pascale G. Charest,

Daniel G. Bichet et Michel Bouvier

Soumis à Molecular Biology of the Cell

2004

L'article intitulé " Probing the ER site of action of the pharmacological chaperone SR121463 reveals a role for DRiP78 upstream of calnexin in the folding of the V2 vasopressin receptor " traite du mécanisme d'action des chaperons pharmacologiques.

Dans cet article, nous avons exploré le mode d'action des chaperons pharmacologiques dans la récupération fonctionnelle des récepteurs V2 mutants portant la mutation W164S. En diminuant la température de croissance des cellules exprimant les récepteurs mutants, une augmentation de l'expression à la surface cellulaire des récepteurs a été observée. Ce résultat suggère que ces récepteurs mutants seraient retenus dans le réticulum endoplasmique dû à un mauvais repliement tel que proposé dans la littérature (Denning et al., 1992). Un traitement avec le chaperon pharmacologique SR121463 a permis la récupération fonctionnelle de ces récepteurs mutants accompagnée d'une diminution de la quantité de récepteurs ciblés pour la dégradation en observant le taux d'ubiquitination. De plus, nous avons démontré que le temps d'interaction entre les récepteurs mutants et la calnexine, un chaperon moléculaire du réticulum endoplasmique, était diminué suite au traitement avec le chaperon pharmacologique, suggérant que les chaperons pharmacologiques agissent avant la dissociation de la calnexine du récepteur. Finalement, nous avons montré que les récepteurs de la vasopressine peuvent interagir avec une autre protéine du réticulum endoplasmique, DRiP78. Cependant, dans ce cas, les chaperons pharmacologiques n'ont aucun effet sur cette interaction suggérant que DRiP78 agit avant les chaperons pharmacologiques et donc avant la calnexine. En faveur avec cette interprétation, alors que la maturation des récepteurs de type sauvage est augmentée, la surexpression de DRiP78 n'a aucun effet sur la maturation des récepteurs mutants. Tous ces résultats suggèrent que les chaperons pharmacologiques stabilisent une conformation native

ou quasi-native de ces récepteurs mutants. De plus, ces résultats nous indiquent que les chaperons pharmacologiques agiraient après DRiP78 mais avant le relâchement de la calnexine.

ABSTRACT

Conformational diseases often result from modest mutations in proteins that are recognized by the endoplasmic reticulum (ER) quality control system as misfolded. These proteins interact for longer periods of time with ER molecular chaperones, are ubiquitinated and degraded by the proteasome and thus cannot reach their site of action. Small molecules, termed pharmacological chaperones, can rescue their export from the ER presumably by interfering with the quality control system. We used an ER-retained mutant (W164S) of the V2 vasopressin receptor (V2R), responsible for nephrogenic diabetes insipidus, to determine at which step of the quality control system the pharmacological chaperones exert their action. The pharmacological chaperone SR121463-promoted rescue of W164SV2R was accompanied by a more efficient maturation and reduced ubiquitination. SR121463 treatment also decreased the interaction time between W164SV2R and the molecular chaperone, calnexin, indicating that the pharmacological chaperone acts either before or while calnexin is bound to the receptor. In contrast, the pharmacological chaperone appears to act downstream of the ER-resident protein, DRiP78, which may be a molecular chaperone acting early in the quality control system rather than an ER export protein as suggested. Taken together, our results suggest that pharmacological chaperones stabilize native or near-native conformations that promote ER-escape.

INTRODUCTION

Numerous quality control mechanisms have evolved to protect living organisms against aberrant cellular activity. One of these systems assures that only completely and correctly folded proteins are allowed to reach their site of action. It involves the participation of numerous accessory proteins known as molecular chaperones that, in addition to assist protein folding, sense various “folding markers” (Smith *et al.*, 1998) to determine if the protein has reached its native conformation. In the cases of secreted or transmembrane glycoproteins, specialized proteins involved in the export from the endoplasmic reticulum (ER) (Tan *et al.*, 2004) then allow the processing of the folded protein through the secretory pathway. If the native conformation is not attained within the time allowed by the quality control system, the protein will be retained in the ER, retrotranslocated to the cytosol and polyubiquitinated before being degraded by the 26S proteasome (Tsai *et al.*, 2002).

Studies carried out in the last decade have linked defects in this quality control system to the etiology of a growing list of congenital and acquired conformational diseases (Carrell and Lomas, 1997;Kopito and Ron, 2000). In parallel, efforts to overcome these defects have led to the development of various interventions, including the use of small molecules that can successfully rescue proteins from the degradation pathway (Morello *et al.*, 2000a;Perlmutter, 2002;Conn *et al.*, 2002;Cohen and Kelly, 2003;Bernier *et al.*, 2004a;Bernier *et al.*, 2004b). However the precise mechanism of action by which these molecules exert their action remains poorly understood.

For ER-retained mutant forms of the V2 vasopressin receptors (V2R), leading to nephrogenic diabetes insipidus (NDI), treatment with small lipophilic vasopressin antagonists such as SR121463, VPA-985 and SR49059 have been shown to rescue their cell surface expression and function (Morello *et al.*, 2000b;Wuller *et al.*, 2004;Bernier *et al.*, 2004c). Although the available data strongly suggest that these compounds act as pharmacological chaperone by binding to the receptor in the ER and stabilizing a conformation that is recognized as competent for ER export, the precise site of action within the quality control system has not been identified.

The molecular chaperone calnexin has been shown to interact with many G protein-coupled receptors (GPCRs) (Rozell *et al.*, 1998;Morello *et al.*, 2001;Siffroi-Fernandez *et al.*, 2002;Lu *et al.*, 2003;Butz *et al.*, 2003) including the V2R (Morello *et al.*, 2001) suggesting a role for this lectin in the folding of this important class of receptors. Consistent with such a role, the interaction time between calnexin and the V2R was found to be significantly longer for a NDI ER-retained mutant form than for the wild-type (WT) receptor (Morello *et al.*, 2001). Such delayed release from calnexin makes its interaction with mutant receptors a marker of choice to probe at which step within the quality control system (ie: before or after calnexin release) the pharmacological chaperones act.

Another ER-resident protein that has been suggested to act at a crucial step in the ER-export of GPCRs is the Dopamine Receptor interacting Protein (DRiP78) which

over-expression was found to promote the ER-retention of the D1 dopamine receptor (D1R) and M2 muscarinic receptor (M2R) (Bermak *et al.*, 2001). The authors suggested that DRiP78 acted by binding to a newly identified ER-export motif (FxxxFxxxF) located in the carboxyl tail of the receptors. Subsequently, over-expression of DRiP78 was reported to increase rather than decrease the export to the cell surface of another GPCR, the angiotensin type 1A receptor (AT_{1A}R), (Leclerc *et al.*, 2002) thus confirming the importance of this protein in GPCR biogenesis but questioning its exact role. The action of DRiP78 as a modulator of ER-export is further challenged by the suggestion that mutations of residue close or within the proposed DRiP78 binding domain lead to misfolding and not ER-export defect (Krause *et al.*, 2000).

In the present study, we have used a NDI ER-retained mutant form of the V2R (W164SV2R) to determine at which step the pharmacological chaperone, SR121463, intervene within the quality control system and to further explore the role of DRiP78 in this process. Our findings indicate that SR121463 acts before the mutant receptor is released from calnexin and strongly suggest that DRiP78 is a molecular chaperone that acts early in the receptor folding process rather than as an ER-export protein.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Dulbeco's modified Eagle's medium (DMEM, fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin, glutamine, fungizone, and phosphate-buffered saline (PBS) were all from Wisent Inc.. Cell culture plates and dishes were obtained from Corning. Bovine serum albumine (BSA) arginine-8 vasopressin (AVP), 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX) were purchased from Sigma Chemical Co. SR121463 was a generous gift from Sanofi-Synthelabo Research. Bradford reagent was acquired from Bio-Rad Laboratories. [3H] adenine, [35S]cysteine/methionine and En³Hance autoradiography enhancer were from NEN Life Science Products. Oregon green conjugated anti-mouse antibodies were purchased from Molecular Probes. Rabbit anti-calnexin and rabbit anti-ubiquitin antibodies were acquired from Stressgen. Rabbit anti-GFP was obtained from Clontech. Anti-myc agarose was from Santa Cruz Biotechnologies. Mouse anti-myc antibodies (9E10 clone) was produced by our core facility as ascite fluids. Biomax films were from Eastman Kodak Co. Scientific Imaging Systems. The DeepBlueC coelenterazine and white Optiplate were from Perkin Elmer Life-Sciences.

DNA construct

The myc-WT V2R (Morello *et al.*, 2000b), WT-*Renilla*-luciferase V2R (WT-*Rluc* V2R) (Bernier *et al.*, 2004c), WT-GFP10 (Charest and Bouvier, 2003) (where GFP10 is a variant form of the GFP containing the following mutations: F64L, Y100F, S108T, M141L, S147P, S202F, I219V and H231L), GFP2-Ubiquitin (Perroy *et al.*, 2004) (where

GFP2 is a variant form of the GFP containing the mutation F64L, Y100F, S108T, M141L, I219V and H231L), GABA α R2-GFP10 (Perroy *et al.*, 2003) and myc-W164SV2R (Bichet *et al.*, 2002) were already available in the laboratory and their construction described before. For BRET experiments, the W164SV2R coding sequence was sub-cloned in frame, 5' of the *Rluc* or GFP10 coding sequence within the pcDNA3.1-V2R-*Rluc* or pcDNA3.1-V2R-GFP10, respectively, by substituting the wild-type receptor sequence for that of the W164SV2R using the *Pst*I and *Hind*III restriction sites. DRiP78 was amplified by PCR from a cDNA library from human brain (graciously provided by Dr. Stephen Michnick, Université de Montréal) using oligonucleotides allowing the insertion of *Nhe*I and *Hind*III restriction sites, 5' and 3' of the DRiP78 coding sequence respectively. Using these restriction sites, DRiP78 was then cloned directly in frame upstream of the GFP2 coding sequence in the pGFP2(N1) vector (Perkin Elmer) leaving a 14 amino acids spacer between the two proteins to generate the DRiP78-GFP2. DRiP78-*Rluc* was obtained by sub-cloning the DRiP78 insert in frame with the *hRluc* coding sequence within the *phRluc*(N1) vector (Perkin Elmer) using the *Nde*I and *Hind*III restriction sites leaving a spacer of 14 amino acids between the two proteins. All DNA constructs were confirmed by direct sequencing.

Cell culture and transfections

HEK293T cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS, 100 U/ml penicillin/streptomycin and 2 mM L-glutamine. Mammalian expression plasmids were transiently transfected in HEK293T cells using the calcium phosphate precipitation procedure (Sambrook J *et al.*, 1989). Cells were allowed to express the foreign DNA for 48 hours before performing the experiments.

Fluorescence microscopy

Immunofluorescence studies were carried out as previously described (Morello *et al.*, 2000b). Briefly, for cell surface immunofluorescence, HEK293T cells transiently expressing the myc-WTV2R or myc-W164SV2R were washed and incubated with antibodies (1:250) directed against the myc-tag present at the N-terminus of receptors for 1 hour at 4°C. The cells were then washed, fixed with 3% PFA in PBS for 15 min at 4°C and permeabilized with PBS/ 0.5% BSA/ 0.2% Triton X-100 for 10 min at room temperature. In the case of permeabilized cells, immunofluorescence was carried out in , cells treated with PBS/ 0.5% BSA/ 0.2% Triton X-100 for 15 min prior addition of the first antibody. Immunoreactivity of the receptor was revealed using secondary Oregon green conjugated anti-mouse antibodies (1:500), the cover slips were mounted on glass microscope slides and the image were acquired on a Nikon-eclipse TE2000-U (Nikon) microscope with a 60X objective or a Leica HM IRBE laser-scanning confocal microscope with a 100X objective.

cAMP accumulation

HEK 293T cells transiently expressing myc-WTV2R or myc-W164SV2R in the presence or absence of different quantities of DRiP78-GFP were metabolically labelled with [³H]adenine (2μCi/well) in 6 well plates for 16 hours at 37°C. They were then washed twice with PBS, stimulated with 10 μM AVP for 20 minutes at 37°C and the reaction stopped at 4°C with 5% tri-chloro acetic acid. The transformation of [³H]ATP into[³H]cAMP was assessed by separating the nucleotides using ions exchange chromatography as previously described (Wong *et al.*, 1991).

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

HEK293T cells transiently expressing myc-W164SV2R were washed and incubated with antibodies (1:500) directed against the myc-epitope for 1 hour at 4°C. Cells were then washed, fixed with 3% PFA in PBS for 15 min at 4°C and incubated with horseradish peroxidase conjugated anti-mouse antibody (1:1000) for 30 minutes. The substrate *o*-phenylenediamine dihydrochloride was added according to the manufacturer's instructions for 7 minutes. The reaction was stopped with 200 µl of 3 N HCl, and extinction was measured at 492 nm.

Metabolic labelling

HEK293T cells transiently expressing myc-WTV2R or myc-W164SV2R were starved for 30 minutes in methionine/cysteine-free DMEM, labelled for 30 minutes with 450 µCi/100mm petri dishes of [³⁵S]-Translabel. Cells were solubilized in 0,5% digitonin for 30 minutes. Immunoprecipitation was then carried out on the solubilized fraction using anti-calnexin or anti-myc antibodies and sepharose-conjugated protein G. Following denaturation of the immunoprecipitate in 1% SDS, the receptors were immunoprecipitated using agarose-coupled anti-myc antibodies. Immunopurified receptors were finally resolved on 10% SDS-PAGE and the gel treated with En³Hance autoradiography enhancer before being exposed to Biomax film at -80°C.

Immunoprecipitation and Western blot

Cells were lysed by sonication and membranes centrifuged at 36 000 g for 20 minutes. The crude membrane preparation was then solubilized in 0.5% *n*-dodecyl-β-D-maltoside (Roche Biochemicals) for 1 hour and centrifuged 1h at 145 000 g to get rid of insoluble

material. Immunopurified receptors, using an anti-myc antibody and sepharose-coupled protein G, were subsequently resolved on 10% SDS-PAGE and transfer on a nitrocellulose membrane. Immunoblotting of DRiP78-GFP and GFP-Ubiquitin were performed using rabbit anti-GFP antibody while the calnexin was performed using rabbit anti-calnexin antibody. Immune complexes were then visualized by chemiluminescence detection using anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated IgG. Immunoblotting of myc-V2R was performed using mouse anti-myc horseradish peroxidase-conjugated IgG.

Bioluminescence resonance energy transfer assay

HEK293T cells transiently transfected with a constant amount of DNA constructs encoding the various *Rluc*-tagged proteins along with increasing quantities of vectors encoding the GFP-tagged were washed with PBS/ 0.1% glucose, detached with PBS/ 5mM EDTA and resuspended in PBS/ 0.1% glucose. Cells were then distributed in 96-well microplates (white Optiplate) at a density of ~100 000 cells/well. DeepBlueC coelenterazine was added at a final concentration of 5 μ M and readings immediately collected using a modified Top-count apparatus (BRETCount, Packard) that allows the sequential integration of the signals detected in the 370-450 nm and 500-530 nm windows using filters (Chroma) with the appropriate band pass. The BRET signal was determined by calculating the ratio of the fluorescence emitted by the protein-GFP10 (500-530 nm) over the light emitted by the protein-*Rluc* (370-450 nm) following the addition DeepBlueC coelenterazine. The values were corrected by subtracting the background signal detected when the protein-*Rluc* was transfected alone. Total luminescence (protein-*Rluc*) and fluorescence (protein-GFP) was measured in each

sample using a lumicount and fluorocount (Perkin Elmer Life Sciences). The BRET signal obtained was plotted against the ratio of *Rluc* luminescence/GFP fluorescence.

Statistical analysis

Statistical significance of the difference was determined using paired Student's t-test analysis.

RESULTS

Functional rescue of W164SV2R by an SR121463 treatment

As indicated in the introduction, non-peptidic antagonists have been proposed to rescue the cell surface expression and function of many NDI ER-retained V2R mutants by binding the mutant proteins in the ER and promoting a conformation that is compatible with ER export and plasma membrane targeting (Morello *et al.*, 2000b; Wuller *et al.*, 2004; Bernier *et al.*, 2004c). To further test this hypothesis and explore where, in the quality control system, this pharmacological chaperoning takes place, we studied the effects of the V2R antagonist, SR121463, on the processing of the ER-retained W164SV2R mutant.

The concept that pharmacological chaperones act by promoting a conformation that is similar or identical to that of the native WT receptor conformation infers that the mutant receptor is retained because it adopts a conformation that is recognized as a misfolded product. To confirm that W164SV2R is indeed retained in the ER because it fails to reach its native state, we took advantage of the fact that decreasing cell growth temperature (from 37°C to ~30°C) slows the folding and quality control processes thus generally helping protein folding and allowing a greater proportion of mutant proteins to reach a near-native state (Denning *et al.*, 1992). To assess the effect of a lower temperature growth on W164SV2R cell surface expression, HEK293T cells transiently expressing N-terminally myc-tagged W164SV2R were grown at either 37°C or 30°C for 16 hours. Cell surface receptor expression was assessed by immunofluorescence

microscopy using an anti-myc antibody. As shown in figure 1, almost no receptor could be detected at the surface of cells grown at 37°C consistent with the ER-retention profile of this mutant. In contrast, substantial surface immunoreactivity was observed in cells grown at 30°C indicating that decreasing the temperature increased the proportion of W164SV2R that could reach the cell surface thus confirming the conformational nature of the mutation.

The pharmacological chaperoning action of SR121463 was then assessed in cells grown at 37°C. As shown in figure 2, treatment with SR121463 for 16 hours restored cell surface expression of myc-W164SV2R as assessed by immunofluorescence microscopy and ELISA. As previously shown for other NDI mutants (Morello *et al.*, 2000b; Wuller *et al.*, 2004; Bernier *et al.*, 2004c), the W164SV2R targeted to the plasma membrane following SR121463 treatment were functional. Indeed, whereas AVP was unable to promote cAMP production in control W164SV2R-expressing cells, a 46 fold AVP-promoted stimulation was observed in SR121463-treated cells (Figure 2C). Taken together, these results confirm that SR121463 acts as a pharmacological chaperone on the W164SV2R conformational mutant. This mutant was therefore used as a model to further explore the molecular mechanism underlying pharmacological chaperoning.

Effect of an SR121463 treatment on W164SV2R ubiquitination

If, as previously proposed, pharmacological chaperones act in the ER by stabilizing near-native conformations, one would predict that the increased maturation

and cell surface expression promoted by SR121463 should be accompanied by a reduction in the number of receptor being targeted for degradation through the ubiquitination-dependent pathway. To test this hypothesis, the effects of SR121463 were assessed in parallel on the maturation and ubiquitination of W164SV2R. To this aim, cells expressing myc-W164SV2R and a GFP-tagged ubiquitin (GFP-Ubi) were treated or not with SR121463 for 16 hours, the receptors solubilized, immunoprecipitated and resolved by SDS-PAGE. The maturation state of the receptor was then assessed by western blot analysis using an anti-myc antibody whereas the extent of ubiquitination was probed on the same membrane using an anti-GFP antibody. In untreated cells, four predominant immunoreactive species corresponding to an deglycosylated degradation intermediate (~38kDa) (Petaja-Repo *et al.*, 2001), the core glycosylated precursor form (~40kDa) (Petaja-Repo *et al.*, 2001), and higher molecular weight species (~70 kDa and ~92 kDa) were detected (Figure 3A). Consistent with the deficient ER processing of W164SV2R, almost no immunoreactivity could be seen at the expected mobility for the mature receptor form (~48kDa). In contrast, an immunoreactive band corresponding to the mature receptor form could be readily detected following SR121463 treatment confirming that the pharmacological chaperone favoured the processing of the core glycosylated precursor to the fully glycosylated mature form of the W164SV2R. The specific glycosylation state of each of the species was confirmed by endoglycosidase H and PNGase F treatments (data not shown). Laser scanning of the blots revealed that the proportion of mature W164SV2R form increased from less than 5% in control conditions to 42% following SR121463 treatment (Figure 3A, lower panel). As shown in figure 3B, the poor processing of W164SV2R in control conditions was accompanied by a

significant basal level of receptor polyubiquitination. Indeed, a strong GFP-ubiquitin immunoreactive signal was detected in the receptor immunoprecipitate that appeared as a smear that extends to the top of the gel; a pattern highly characteristic of protein polyubiquitination. Treatment with SR121463 for 16 hours led to an important decrease in the polyubiquitination immunoreactive signal. When controlled for the total amount of receptor immunoprecipitated, the ubiquitination signal was found to be reduced by 52% (Figure 3B, lower panel) indicating that the increased receptor maturation is accompanied by a decrease in the proportion of receptor being targeted to the polyubiquitination-dependent degradation pathway. Similar results were obtained when the ubiquitination was assessed using a polyclonal anti-ubiquitin antibody to reveal the blots or after sequentially immunoprecipitating the ubiquitinated proteins and then the receptor confirming that the signal resulted from the ubiquitination of the receptor itself (data not shown).

Two distinct mechanisms can be invoked to explain the SR121463-promoted reduction on W164SV2R ubiquitination. 1) Binding of the pharmacological chaperone stabilizes folding intermediates, allowing longer time for the receptor to reach its native conformation thus resulting in less receptor being targeted to the polyubiquitination/degradation pathway. 2) Binding of the pharmacological chaperone favours the folding of the receptor either by inducing the proper folding or by stabilizing native or near-native conformations thus actively leading to the ER-escape and maturation of a greater proportion of the receptor. These two hypothetical mechanisms of action would have opposite effects on the interaction between the folding receptor and

specific molecular chaperones. Indeed, stabilization of folding intermediates should result in a longer interaction with molecular chaperones that assist folding while stabilization of native or near-native conformation should decrease such interactions. As indicated in the introduction, one of the molecular chaperones that have been previously proposed to assist folding of the V2R is calnexin (Morello *et al.*, 2001).

Effect of an SR121463 treatment on the interaction between calnexin and W164SV2R

To assess the effect of SR121463 treatment on the interaction between W164SV2R and the molecular chaperone calnexin, the amount of calnexin associated to the receptor was first assessed by Western blot analysis following the immunoprecipitation of myc-W164SV2R transiently expressed in HEK293T cells. As previously observed in figure 3A, 16 hour treatment with SR121463 led to a dramatic increase in the amount of fully glycosylated mature W164SV2R monomers (Figure 4A). This increase in maturation efficacy was accompanied by a significant reduction of the calnexin co-immunoprecipitated with the receptor as assessed by the probing of the same membranes with an anti-calnexin antibody (Figure 4B). When controlled for the amount of receptor immunoprecipitated, the amount of calnexin associated with the receptor was found to be reduced by 55 % following SR121463 treatment (Figure 4B, lower panel). This effect of SR121463 on the interaction with calnexin is consistent with a model whereby the pharmacological chaperone stabilizes native or near-native conformations leading to an accelerated release of the mutant receptor from calnexin.

To directly test the hypothesis that SR121463 treatments changes the kinetic of interaction between the mutant receptor and calnexin, the association time between W164SV2R and the molecular chaperone was directly assessed in pulse-chase labelling experiments. For this purpose, cells expressing W164SV2R were treated or not with SR121463 for 16 hours before being labelled for 30 minutes in a methionine/cysteine-free medium containing [³⁵S]methionine/cysteine. A chase of up to 90 minutes was then initiated in the continued presence or absence of SR121463 and the maturation of the receptor as well as its association with calnexin assessed by sequential immunoprecipitation. As shown in figure 5A, only the precursor (~40kDa) and deglycosylated degradation intermediate (~38kDa) could be readily detected in untreated cells following receptor immunoprecipitation. No increase in the mature receptor form could be detected during the chase under control conditions despite the time-dependent decrease in the radio-labelled precursor form confirming that almost all synthesized W164SV2R are targeted for degradation. In contrast, appreciable maturation could be seen during the chase period, following SR121463 treatment, as indicated by the apparition of the ~48kDa mature form of the receptor. Using the same samples, the evolution of the calnexin-associated receptors was assessed by first immunoprecipitating calnexin and then the receptor present in the calnexin immunoprecipitate. As expected, only the precursor form and the deglycosylated degradation intermediate were co-immunoprecipitated with calnexin whether the cells were treated or not with SR121463 (Figure 5B). The amount of radio-labelled receptor associated with calnexin decreased during the chase period reflecting the release of receptor from calnexin either to enter the

secretory pathway or to be targeted for degradation. Although such dissociation occurred both in SR121463-treated and untreated cells, the treatment with the pharmacological chaperone dramatically increased the rate of dissociation. Indeed, while more than 50% of the receptor initially (before initiating the chase) co-immunoprecipitated with calnexin were still associated with the molecular chaperone after 90 minutes of chase under basal conditions, almost no receptor could be detected at the same time when the cells were pre-treated with SR121463 (Figure 5B). The quicker release from calnexin promoted by the SR121463 indicates that the pharmacological chaperone acts before or while calnexin is bound to the receptor most likely by stabilizing a native or near-native conformation.

Although the effect of the pharmacological chaperone treatment on the ubiquitination and calnexin interaction kinetics are consistent with the notion that the SR121463 acts by binding and stabilizing specific conformation(s) of the receptor in the ER, these data do not rule out a possible role for SR121463-promoted signalling at the cell surface. Indeed, SR121463 has previously been shown to act as an inverse agonist inhibiting the spontaneous receptor-stimulated adenylyl cyclase activity and weakly activating the mitogen-activated protein kinase (Azzi *et al.*, 2003). To test whether the signalling activity of SR121463 could play a role in its pharmacological chaperoning action, the effects of a 16 hour SR121463 treatment were assessed in the presence of a 100 fold excess of the peptide antagonist, H3192, that cannot cross the membrane but should occupy all surface receptor and either block or mimic the possible signalling effect of SR121463 at the plasma membrane. The concomitant treatment with H3192 did not mimic nor block the effect of SR121463 on the ubiquitination state or on the

interaction with calnexin (data not shown), confirming that SR121463 acted intracellularly.

Dimerization of V2R

Since GPCR homo and heterodimerization have been suggested to occur early in the biosynthetic pathway most likely in the ER (Terrillon and Bouvier, 2004) and to possibly play a role in quality control (Salahpour *et al.*, 2004; Kaykas *et al.*, 2004) and receptor trafficking (Marshall *et al.*, 1999; Hague *et al.*, 2004a; Hague *et al.*, 2004b), we next examined whether a mutation such as W164S, which leads to the ER-retention of the receptor, could affect the propensity of the receptor to dimerize and whether pharmacological chaperone could influence such dimerization. To address these questions, we took advantage of a bioluminescence resonance energy transfer (BRET) approach that allows to probe the proximity between two proteins by measuring the transfer of energy between a luminescent donor (*Rluc*) and a fluorescent acceptor (GFP) attached to the proteins of interest (Xu *et al.*, 1999) and was successfully used to study GPCR dimerization in living cells (Angers *et al.*, 2000; Kroeger *et al.*, 2001; Mercier *et al.*, 2002; Ramsay *et al.*, 2002; Terrillon *et al.*, 2003). The dimerization of WTV2R and W164SV2R was therefore monitored by measuring the transfer of energy between WT- and W164S- V2R-*Rluc* and V2R-GFP10 fusion proteins. The two hybrid proteins were transiently co-transfected in HEK293T cells and the energy transfer between the two partners determined following the addition of coelenterazine DeepBlueC, the substrate for *Rluc*. The propensity of the receptor to dimerize was specifically assessed in BRET

titration experiments where the amount of the energy donor (receptor-Rluc fusion) is maintained constant while the amount of energy acceptor (receptor-GFP10 fusion) is gradually increased. The BRET signal is then expressed as a function of the ratio of total GFP10 fluorescence/ total Rluc luminescence. As previously reported, such analysis allows to distinguish specific from non-specific interactions and to compare the relative propensity of receptors to assemble into oligomeric complexes (Mercier *et al.*, 2002; Ramsay *et al.*, 2002). As shown in figure 6, the BRET signal increased as a hyperbolic function of the GFP10/Rluc ratio for both the W164SV2R-Rluc/W164SV2R-GFP10 and WTV2R-Rluc/WTV2R-GFP10 pairs consistent with the formation of specific dimers for the two receptors. This contrasts with the weak and quasi-linear increase in the BRET signal observed between W164SV2R-Rluc and the unrelated GPCR GABAbR2-GFP10 used as specificity control. The positive BRET signal observed for the WT V2R confirms previous studies demonstrating that this receptor can readily form homodimers (Terrillon *et al.*, 2003). The very similar BRET curves observed for the WTV2R and W164SV2R dimers indicates that the mutation did not noticeably influenced the dimerization process suggesting that the oligomeric assembly occurs before the receptor reaches its completely folded native conformation. Consistent with this conclusion that dimerization occurs previous to ER-export most likely very early in the folding processes is the observation that treatment with the SR121463 did not affect the BRET titration curve observed for the W164SV2R-Rluc/W164SV2R-GFP10 pair (Figure 6) suggesting that the pharmacological chaperone action occurs downstream of the dimerization process.

Effect of an SR121463 treatment on the interaction between DRiP78 and W164SV2R

The preceding results indicate that assessing the effect of the pharmacological chaperone on specific steps of the quality control system allows their relative positioning in the cascade of events leading from receptor initial folding to its export from the ER. As indicated in the introduction, a previous study has suggested that DRiP78, an ER-resident transmembrane protein, could act as ER export protein for GPCR (Bermak *et al.*, 2001). However, other data have indicated that the receptor region involved in DRiP78 binding is implicated in receptor folding rather than export (Krause *et al.*, 2000) thus raising questions concerning the exact role of this newly uncovered ER protein. In an effort to further our understanding of the role of DRiP78, we took advantage of the pharmacological chaperone action to locate DRiP78 within the quality control cascade. Indeed, if DRiP78 acts as a specialized ER-export protein downstream of the effect of SR121463 on calnexin, one would expect that its interaction with ER-retained mutant receptors would be affected by the pharmacological chaperone. To test this hypothesis, we investigated the interactions between DRiP78 and both WTV2R and W164SV2R in the presence and absence of SR121463.

First, the subcellular distribution of DRiP78, WTV2R and W164SV2R was assessed by confocal fluorescence microscopy. As shown in figure 7A, DRiP78-GFP colocalized almost perfectly with the W164SV2R in a perinuclear region and a

reticulated network of permeabilized cells, consistent with the ER localization of the two proteins. This contrast with the lack of colocalization between DRiP78-GFP and the cell surface WTV2R in non-permeabilized cells (Figure 7B) confirming that DRiP78 cannot reach the plasma membrane and is most likely an ER-resident protein (Bermak *et al.*, 2001).

The potential interaction between DRiP78 and both WTV2R and W164SV2R was then assessed by co-immunoprecipitation. myc-W164SV2R or myc-WTV2R transiently expressed with DRiP78-GFP were immunoprecipitated using an anti-myc antibody and the extent of association with DRiP78-GFP assessed by Western blot analysis using an anti-GFP antibody. As shown in figure 7C, DRiP78 could be co-immunoprecipitated with both W164SV2R and WTV2R and the SR121463 treatment was without apparent effect on the extent of co-immunoprecipitation (data not shown). Although the co-immunoprecipitation data indicate that the SR121463 treatment does not effect the interaction of W164SV2R with DRiP78, this interaction was further investigated in living cells using BRET.

To monitor the interaction between the receptors and DRiP78, BRET titration curves were carried out as described above in cells transiently co-expressing DRiP78-*Rluc* and either WTV2R-GFP10 or W164SV2R-GFP10. As shown in figure 8A, hyperbolic and saturable BRET titration curves were obtained for both WTV2R-GFP10 and W164SV2R-GFP10 indicating specific interactions between DRiP78 and the V2Rs. Similarly to what was observed in the co-immunoprecipitation experiments, the 16 hour treatment with SR121463 was without effect on the BRET titration curve for either

WTV2R or W164SV2R indicating that the pharmacological chaperone is without effect on the interaction between the receptors and DRiP78. These results indicate that DRiP78 acts before the pharmacological chaperone within the ER quality control cascade. Given the fact that the SR121463 treatment did decrease the extent and the time of interaction between W164SV2R and calnexin, these data strongly suggest that DRiP78 acts on the receptor before calnexin and thus probably not as an ER-export protein.

As indicated above, previous studies have suggested that DRiP78 overexpression can inhibit the cell surface expression of D1R and M2R (Bermak *et al.*, 2001). It could therefore be argued that the lack of effect of SR121463 treatment on the interaction between W164SV2R and DRiP78 could be due to an inhibition of the export of the receptor resulting from the overexpression of DRiP78-GFP10. To directly test this possibility, we again used BRET but this time taking advantage of the fact that the extent of the maximal BRET signal is determined by the proportion of the total *Rluc*-fusion protein that is available for the interaction. Indeed, the *Rluc*-fusion protein that is unavailable for the interaction (for example as a result of localization in a different subcellular compartment) contributes to a luminescence signal that cannot be transmitted to the GFP10-fusion protein thus yielding a lower maximal BRET signal (the BRET signal being calculated as the ratio of light emitted by the GFP10/ the total luminescence). Thus, the effect of the SR121463 on the exit of W164SV2R from the ER was assessed by monitoring the BRET between W164SV2R-*Rluc* and DRiP78-GFP10 (the inverse orientation of the one used to probe the interaction between the receptors and DRiP78 in the ER). As shown in figure 8B, the maximal BRET signal obtained between

W164SV2R-Rluc and DRiP78-GFP10 was dramatically reduced by the pharmacological chaperone treatment indicating that an important proportion of the W164SV2R-Rluc was exported from the ER and thus could not interact anymore with the ER-resident DRiP78-GFP10. As expected, the SR121463 treatment had no effect on the maximal BRET signal observed between WTV2R-Rluc and DRiP78-GFP10 consistent with the fact that this receptor could already be exported out of the ER under basal conditions. Taken together, these results clearly indicate that overexpression of DRiP78-GFP10 did not inhibit the pharmacological chaperone action on the ER export of W164SV2R. Therefore, the lack of effect of SR121463 on the interaction between the mutant receptor and DRiP78, assessed in the ER, most-likely reflects an action of the pharmacological chaperone downstream of DRiP78.

The effect of DRiP78 on the receptor expression was then directly assessed. For this purpose, myc-W164SV2R or myc-WTV2R were co-expressed with different concentrations of DRiP78-GFP, the receptors immunoprecipitated and the myc-immunoreactivity revealed by Western-blot analysis. As shown in figure 9A, overexpression of DRiP78 had no effect on the amount of immunoreactive W164SV2R detected. Not only was the amount of precursor form not increased but the overexpression of DRiP78 did not promote the formation of mature receptors that remained undetectable. Not surprisingly, no vasopressin-stimulated cAMP accumulation could be detected in cells expressing W164SV2R whether DRiP78 was overexpressed or not consistent with the lack of mature receptor (Figure 9B). In contrast, overexpressing DRiP78 had a dose dependent effect on the amount of immunoreactive WTV2R immunoprecipitated (Figure 9C). Interestingly, both the precursor and mature forms of

the receptors appeared to be increased proportionally indicating that DRiP78 stabilized folding intermediates rather than promoting the maturation of an increased proportion of the receptor. This increase in receptor expression was accompanied by a significant potentiation of the vasopressin-stimulated cAMP production observed in cells co-expressing myc-WTV2R and DRiP78-GFP (Figure 9D) confirming that more mature and functional receptors were expressed in these cells. These results suggest that overexpression of DRiP78 is not sufficient to correct the misfolding of a mutant V2R but can promote the processing of properly folded WT receptor.

DISCUSSION

Previous studies have shown that pharmacologically selective receptor ligands can rescue cell surface expression and function of otherwise ER-retained mutant GPCRs (Reviewed in (Bernier *et al.*, 2004a)). Based on the observations that only lipophilic compounds permeating cell membranes have this effect (Morello *et al.*, 2000b;Petaja-Repo *et al.*, 2002;Janovick *et al.*, 2002;Bernier *et al.*, 2004c) and that treatment with these compounds promoted receptor maturation from core glycosylated precursor to fully glycosylated mature forms (Morello *et al.*, 2000b;Petaja-Repo *et al.*, 2002;Bernier *et al.*, 2004c), it was proposed that the ligands acted as pharmacological chaperones by binding to the receptors in the ER, somehow allowing them to escape the quality control system and reach their site of action. In the present study, the demonstration that SR121463 decreases the ubiquitination of the ER-retained W164SV2R mutant and modulates its interaction with the molecular chaperone calnexin unambiguously confirms the ER as the site of action of the pharmacological chaperone.

Although the pharmacological chaperones act in the ER, their selectivity of action indicate that they interact with the receptor through its classical binding pocket thus inferring that the receptor has to be at least partially folded before the pharmacological chaperone can act. This leaves two potential mechanisms of action. 1) The pharmacological chaperone binds and stabilizes folding intermediates that have acquired at least a primitive binding pocket, protecting them against aggregation or degradation thus allowing longer time for the receptor to reach the native conformation that can then

escape the ER. This “kinetically based” mechanism of action is reminiscent of the one proposed to explain the effect of cell growth temperature on protein maturation efficacy (Denning *et al.*, 1992). 2) The pharmacological chaperone favours the folding of the receptor either by inducing the proper folding or by stabilizing native or near-native conformations thus actively leading to the ER-escape. The observation that SR121463 treatment decreased the interaction time between the folding receptor and calnexin clearly favours the second mechanism since stabilization and protection of folding intermediates against degradation should have lead to an increased association time with calnexin. Our finding that calnexin can interact with V2R and that this interaction can be modulated by selective receptor ligands also confirms previous findings indicating that this molecular chaperone of the primary quality control system plays an important role in the folding of GPCR (Rozell *et al.*, 1998;Morello *et al.*, 2001;Siffroi-Fernandez *et al.*, 2002;Lu *et al.*, 2003;Butz *et al.*, 2003). Of particular interest, we found that calnexin could be co-immunoprecipitated with both the core-glycosylated precursor and deglycosylated degradation intermediate of the receptor. This is consistent with the dual role that calnexin plays in assisting the folding of the protein precursors on one hand and escorting the protein that cannot reach their native state to the degradation machinery on the other hand (Kamhi-Nesher *et al.*, 2001).

Given the important role that calnexin is believed to play in sensing and controlling protein folding in the ER, it may not be surprising to find that the pharmacological chaperone influences its interaction with ER-retained receptors. However, in addition to show that the pharmacological chaperones interact with the

receptors and have their action before the receptor leaves calnexin, this finding provides a useful tool to position specific receptor folding events in relation to calnexin. The observation that W164SV2R and WTV2R had the same propensity to dimerize and that SR121463 had no influence on the dimerization clearly positions receptor dimer assembly before calnexin binding demonstrating as previously suggested that GPCR dimerization occurs at an early step in the biosynthetic pathway (Terrillon *et al.*, 2003; Salahpour *et al.*, 2004) most likely before folding is completed.

The lack of effect of SR121463 on the interaction between W164SV2R and DRiP78 in the ER clearly indicates that DRiP78 is acting before the receptor leaves calnexin. Indeed, if DRiP78 acted downstream from calnexin, one would predict that the SR121463-promoted release of W164SV2R from calnexin would lead to an increased interaction between the mutant receptor and DRiP78. This observation contrasts with the proposition that DRiP78 could be an ER-export molecule for GPCRs (Bermak *et al.*, 2001) which by definition should act downstream of calnexin release. It may rather suggest that DRiP78 is a molecular chaperone; a proposition in line with the demonstration that a hydrophobic motif located close to the putative DRiP78 binding site of V2R serves as folding sensor and not ER-export signal (Krause *et al.*, 2000).

Two main groups of molecular chaperones involved in the process of folding of secreted and membrane proteins have been described (Molinari and Helenius, 2000). The first group, a pre-assembled complex including BiP (or GRP78), GRP94, CaBP1, PDI, cyclophilin B, ERp72, GRP170, UDP-glucosyltransferase and SDF2-L1, functions more

by preventing aggregation of newly synthesized proteins by binding to hydrophobic patches and act while the protein is being translocated in the ER lumen (Meunier *et al.*, 2002). The second group of molecular chaperones, including calnexin and calreticulin, would have a more active role in assisting the folding of the neo-synthesized proteins (Molinari and Helenius, 2000). Since DRiP78 appears to bind close to a hydrophobic motif (Bermak *et al.*, 2001) and to exert its action before calnexin, it could be proposed that DRiP78 may belong to the first group of molecular chaperones interacting with BiP. Such an early action of DRiP78 with a group of molecular chaperones involved in protecting the neo-nascent protein against aggregation and degradation rather than in the active folding or in ER export would be consistent with the observation that its overexpression can increase both the precursor and mature forms of the WT receptor without assisting the folding of the mutant receptor.

In conclusion, our data clearly indicate that the pharmacological chaperone SR121463 rescues cell surface expression and function of the ER-retained W164SV2R by stabilizing native or quasi-native receptor conformation thus favouring a rapid release from calnexin. Our data also suggest that the recently discovered ER-resident protein DRiP78 functions as a molecular chaperone acting upstream of calnexin rather than as an ER-export protein as previously suggested. Taken together, our results clearly demonstrate that pharmacological chaperones can restore the biological function of ER-retained mutants by interfering with specific steps of the quality control system of the ER thus opening the way for the development of new therapeutic strategies targeting the quality control system for the treatment of the growing list of conformational diseases.

REFERENCES

- Angers,S., Salahpour,A., joly,E., Hilaiet,S., Chelsky,D., Dennis,M., Bouvier,M. (2000). Detection of beta2-Adrenergic Receptor Dimerization in Living Cells Using Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET). *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 97, 3684-3689.
- Azzi,M., Charest,P.G., Angers,S., Rousseau,G., Kohout,T., Bouvier,M., Pineyro,G. (2003). Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100, 11406-11411.
- Bermak,J.C., Li,M., Bullock,C., Zhou,Q.Y. (2001). Regulation of transport of the dopamine D1 receptor by a new membrane-associated ER protein. *Nat.Cell Biol.* 3, 492-498.
- Bernier,V., Bichet,D.G., Bouvier,M. (2004a). Pharmacological chaperone action on G-protein-coupled receptors. *Curr.Opin.Pharmacol.* 4, 528-533.
- Bernier,V., Lagace,M., Bichet,D.G., Bouvier,M. (2004b). Pharmacological chaperones: potential treatment for conformational diseases. *Trends Endocrinol.Metab* 15, 222-228.
- Bernier,V., Lagace,M., Lonergan,M., Arthus,M.F., Bichet,D.G., Bouvier,M. (2004c). Functional rescue of the constitutively internalized V2 Vasopressin receptor mutant R137H by the pharmacological chaperone action of SR49059. *Mol.Endocrinol.* 18, 2074-2084.

Bichet, D. G., Bouvier, M., Brouard, R., Morello, J.-P., Bernier, V., Lonergan, M., and Arthus, M. F. Decrease in urine volume and increase in urine osmolality after SR49059 administration in five adult male patients with X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *J.Am.Soc.Nephrol.* abstract no SA-FC193 13:40A. 2002.

Butz, J.A., Niebauer, R.T., Robinson, A.S. (2003). Co-expression of molecular chaperones does not improve the heterologous expression of mammalian G-protein coupled receptor expression in yeast. *Biotechnol.Bioeng.* 84, 292-304.

Carrell, R.W., Lomas, D.A. (1997). Conformational disease. *Lancet* 350, 134-138.

Charest, P.G., Bouvier, M. (2003). Palmitoylation of the V2 vasopressin receptor carboxyl tail enhances beta-arrestin recruitment leading to efficient receptor endocytosis and ERK1/2 activation. *J Biol.Chem.* 278, 41541-41551.

Cohen, F.E., Kelly, J.W. (2003). Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases. *Nature* 426, 905-909.

Conn, P.M., Leanos-Miranda, A., Janovick, J.A. (2002). Protein Origami : Therapeutics Rescue of Misfolded Gene Products. *Molecular interventions* 2, 308-316.

Denning, G.M., Anderson, M.P., Amara, J.F., Marshall, J., Smith, A.E., Welsh, M.J. (1992). Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive [see comments]. *Nature* 358, 761-764.

Hague,C., Uberti,M.A., Chen,Z., Bush,C.F., Jones,S.V., Ressler,K.J., Hall,R.A., Minneman,K.P. (2004a). Olfactory receptor surface expression is driven by association with the beta2-adrenergic receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101, 13672-13676.

Hague,C., Uberti,M.A., Chen,Z., Hall,R.A., Minneman,K.P. (2004b). Cell surface expression of alpha1D-adrenergic receptors is controlled by heterodimerization with alpha1B-adrenergic receptors. *J.Biol.Chem.* 279, 15541-15549.

Janovick,J.A., Maya-Nunez,G., Conn,P.M. (2002). Rescue of hypogonadotropic hypogonadism-causing and manufactured GnRH receptor mutants by a specific protein-folding template: misrouted proteins as a novel disease etiology and therapeutic target. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 87, 3255-3262.

Kamhi-Nesher,S., Shenkman,M., Tolchinsky,S., Fromm,S.V., Ehrlich,R., Lederkremer,G.Z. (2001). A novel quality control compartment derived from the endoplasmic reticulum. *Mol.Biol.Cell* 12, 1711-1723.

Kaykas,A., Yang-Snyder,J., Heroux,M., Shah,K.V., Bouvier,M., Moon,R.T. (2004). Mutant Frizzled 4 associated with vitreoretinopathy traps wild-type Frizzled in the endoplasmic reticulum by oligomerization. *Nat.Cell Biol.* 6, 52-58.

Kopito,R.R., Ron,D. (2000). Conformational disease. *Nat.Cell Biol.* 2, E207-E209.

Krause,G., Hermosilla,R., Oksche,A., Rutz,C., Rosenthal,W., Schulein,R. (2000). Molecular and conformational features of a transport-relevant domain in the C-terminal tail of the vasopressin V(2) receptor. *Mol.Pharmacol.* 57, 232-242.

Kroeger,K.M., Hanyaloglu,A.C., Seeber,R.M., Miles,L.E., Eidne,K.A. (2001). Constitutive and agonist-dependent homo-oligomerization of the thyrotropin-releasing hormone receptor. Detection in living cells using bioluminescence resonance energy transfer. *J.Biol.Chem.* 276, 12736-12743.

Leclerc,P.C., Auger-Messier,M., Lanctot,P.M., Escher,E., Leduc,R., Guillemette,G. (2002). A polyaromatic caveolin-binding-like motif in the cytoplasmic tail of the type 1 receptor for angiotensin II plays an important role in receptor trafficking and signaling. *Endocrinology* 143, 4702-4710.

Lu,M., Echeverri,F., Moyer,B.D. (2003). Endoplasmic reticulum retention, degradation, and aggregation of olfactory G-protein coupled receptors. *Traffic.* 4, 416-433.

Marshall,F.H., Jones,K.A., Kaupmann,K., Bettler,B. (1999). GABAB receptors - the first 7TM heterodimers. *Trends Pharmacol.Sci.* 20, 396-399.

Mercier,J.F., Salahpour,A., Angers,S., Breit,A., Bouvier,M. (2002). Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol.Chem.* 277, 44925-44931.

Meunier,L., Usherwood,Y.K., Chung,K.T., Hendershot,L.M. (2002). A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. *Mol.Biol.Cell* 13, 4456-4469.

Molinari,M., Helenius,A. (2000). Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum. *Science* 288, 331-333.

Morello,J.P., Petaja-Repo,U.E., Bichet,D.G., Bouvier,M. (2000a). Pharmacological chaperones: a new twist on receptor folding. *Trends Pharmacol.Sci.* 21, 466-469.

Morello,J.P., Salahpour,A., Laperriere,A., Bernier,V., Arthus,M.F., Lonergan,M., Petaja-Repo,U., Angers,S., Morin,D., Bichet,D.G., Bouvier,M. (2000b). Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants. *J.Clin.Invest* 105, 887-895.

Morello,J.P., Salahpour,A., Petaja-Repo,U.E., Laperriere,A., Lonergan,M., Arthus,M.F., Nabi,I.R., Bichet,D.G., Bouvier,M. (2001). Association of calnexin with wild type and mutant AVPR2 that causes nephrogenic diabetes insipidus. *Biochemistry* 40, 6766-6775.

Perlmutter,D.H. (2002). Chemical chaperones: a pharmacological strategy for disorders of protein folding and trafficking. *Pediatr.Res.* 52, 832-836.

Perroy,J., Adam,L., Qanbar,R., Chenier,S., Bouvier,M. (2003). Phosphorylation-independent desensitization of GABA(B) receptor by GRK4. *EMBO J* 22, 3816-3824.

Perroy, J., Pontier, S. M., Charest, P. G., Aubry, M., and Bouvier, M. Real time monitoring of ubiquitination in living cells by BRET. *Nature Methods*. 2004. In Press

Petaja-Repo,U.E., Hogue,M., Bhalla,S., Laperriere,A., Morello,J.P., Bouvier,M. (2002). Ligands act as pharmacological chaperones and increase the efficiency of delta opioid receptor maturation. *EMBO J.* 21 , 1628-1637.

Petaja-Repo,U.E., Hogue,M., Laperriere,A., Bhalla,S., Walker,P., Bouvier,M. (2001). Newly synthesized human delta opioid receptors retained in the endoplasmic reticulum

are retrotranslocated to the cytosol, deglycosylated, ubiquitinated, and degraded by the proteasome. *J.Biol.Chem.* 276, 4416-4423.

Ramsay,D., Kellett,E., McVey,M., Rees,S., Milligan,G. (2002). Homo- and hetero-oligomeric interactions between G-protein-coupled receptors in living cells monitored by two variants of bioluminescence resonance energy transfer (BRET): hetero-oligomers between receptor subtypes form more efficiently than between less closely related sequences. *Biochem.J.* 365, 429-440.

Rozell,T.G., Davis,D.P., Chai,Y., Segaloff,D.L. (1998). Association of gonadotropin receptor precursors with the protein folding chaperone calnexin. *Endocrinology* 139, 1588-1593.

Salahpour,A., Angers,S., Mercier,J.F., Lagace,M., Marullo,S., Bouvier,M. (2004). Homodimerization of the beta2-adrenergic receptor as a prerequisite for cell surface targeting. *J.Biol.Chem.* 279, 33390-33397.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). In: *Molecular cloning a laboratory manual* Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Siffroi-Fernandez,S., Giraud,A., Lanet,J., Franc,J.L. (2002). Association of the thyrotropin receptor with calnexin, calreticulin and BiP. Effects on the maturation of the receptor. *Eur.J.Biochem.* 269, 4930-4937.

Smith,D.F., Whitesell,L., Katsanis,E. (1998). Molecular chaperones: biology and prospects for pharmacological intervention. *Pharmacol.Rev.* 50, 493-514.

Tan,C.M., Brady,A.E., Nickols,H.H., Wang,Q., Limbird,L.E. (2004). Membrane trafficking of G protein-coupled receptors. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 44, 559-609.

Terrillon,S., Bouvier,M. (2004). Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep.* 5, 30-34.

Terrillon,S., Durroux,T., Mouillac,B., Breit,A., Ayoub,M.A., Taulan,M., Jockers,R., Barberis,C., Bouvier,M. (2003). Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis. *Mol.Endocrinol.* 17, 677-691.

Tsai,B., Ye,Y., Rapoport,T.A. (2002). Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 3, 246-255.

Wong,Y.H., Federman,A., Pace,A.M., Zachary,I., Evans,T., Pouyssegur,J., Bourne,H.R. (1991). Mutant alpha subunits of Gi2 inhibit cyclic AMP accumulation. *Nature* 351, 63-65.

Wuller,S., Wiesner,B., Loffler,A., Furkert,J., Krause,G., Hermosilla,R., Schaefer,M., Schulein,R., Rosenthal,W., Oksche,A. (2004). Pharmacochaperones post-translationally enhance cell surface expression by increasing conformational stability of wild-type and mutant vasopressin V2 receptors. *J.Biol.Chem.* 279, 47254-47263.

Xu,Y., Piston,D.W., Johnson,C.H. (1999). A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 151-156.

FOOTNOTES

¹ The abbreviations used are : AT_{1A}R, angiotensine type 1A receptor; AVP, arginine-vasopressin; BRET, Bioluminescence Resonance Energy Transfer; D1R, D1 dopamine receptor; DRiP78, Dopamine receptor interacting protein; ER, endoplasmic reticulum; GFP, Green Fluorescent Protein; GPCR, G protein-coupled receptor; HEK293T, Human Embryonic Kidney 293 cells; M2R, M2 muscarinic receptor; NDI, nephrogenic diabetes insipidus; *Rluc*, *Renilla* luciferase; V2R, V2 vasopressin receptor; WT, wild type

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Dr. Claudine Serradeil-Le Gal (Sanofi-Synthelabo Research) for the generous gift of the SR121463. We also thank Dr Monique Lagacé for insightful discussions and the critical reading of the manuscript as well as Louise Cournoyer for technical assistance.

FIGURES LEGENDS

Figure 1 : Cell surface expression of W164SV2R at different growth temperature.

HEK293T cells transiently expressing myc-W164SV2R were incubated at 37°C or 30°C. Surface receptors were detected with mouse anti-myc antibody under non-permeabilized condition. The immunoreactivity was revealed with an Oregon green-conjugated secondary antibody and visualized by fluorescence microscopy using a Nikon-eclipse TE2000-U microscope with a 60X oil immersion objective. The images shown are representative of many fields observed in two independent experiments.

Figure 2 : Functional rescue of W164SV2R following an SR121463 treatment. A.

HEK293T cells transiently expressing myc-W164SV2R were incubated in the presence or absence of 10^{-5} M SR121463 for 16 hours. Surface receptors were detected with mouse anti-myc antibody under non-permeabilized condition, the immunoreactivity revealed with an Oregon green-conjugated secondary antibody and visualized by fluorescence microscopy using a Nikon-eclipse TE2000-U microscope with a 60X oil immersion objective. The images shown are representative of many fields observed in five independent experiments. **B.** Surface receptors were detected using mouse anti-myc antibody under non-permeabilized condition followed by horseradish peroxidase conjugated anti-mouse antibody. After the addition of the substrate *o*-phenylenediamine dihydrochloride, for 7 minutes, the reaction was stopped with 200 μ l of 3 N HCl and the extinction was measured at 492 nm. The data represent the mean \pm SEM of four independent experiments (* $p < 0.05$). **C.** AVP-stimulated cAMP accumulation was measured in HEK293T cells transiently expressing the myc-W164SV2R. Cells were

labelled with [^3H]adenine and treated or not with 10^{-5}M SR121463 for 16 hours. Cells were then washed extensively and incubated or not with 10^{-5}M AVP for 20 minutes. Following cell lysis, [^3H]cAMP was purified by ion exchange chromatography. Data are expressed as [^3H]cAMP/([^3H]ATP+[^3H]cAMP) and represent the mean \pm SEM of three independent experiments (* $p < 0.05$).

Figure 3 : Ubiquitination of W164SV2R following SR121463 treatment. HEK293T cells transiently expressing myc-W164SV2R and GFP-Ubiquitin were incubated in the presence or absence of 10^{-5}M SR121463 for 16 hours. The receptors were solubilized, immunoprecipitated with a mouse anti-myc antibody, migrated in a denaturing gel and transferred on a nitrocellulose membrane. **A.** The membrane was first incubated with a Horseradish peroxidase-conjugated anti-myc and revealed by autoradiography. The deglycosylated degradation intermediate (D), precursor (P), mature (M) and higher molecular weight (\square) species are indicated. The intensity of the bands were determined by densitometry and the proportion of the M/(M+P) species determined. The data shown represent the mean \pm SEM of four independent experiments (* $p < 0.05$). **B.** The same membrane was then incubated with a rabbit anti-GFP antibody and revealed by autoradiography. The intensity of the bands were determined by densitometry and the proportion of the ubiquitination /(M+P) species determined. The data shown represent the mean \pm SEM of four independent experiments (* $p < 0.01$).

Figure 4 : Interaction between calnexin and W164SV2R following SR121463 treatment. HEK293T cells transiently expressing myc-W164SV2R were incubated in the

presence or absence of 10^{-5} M SR121463 for 16 hours. The receptors were solubilized, immunoprecipitated with a mouse anti-myc antibody, migrated in a denaturing gel and transfer on a nitrocellulose membrane. **A.** The membrane was first incubated with a Horseradish peroxidase-conjugated anti-myc and revealed by autoradiography. The deglycosylated degradation intermediate (D), precursor (P), mature (M) and higher molecular weight (α) species are indicated. The intensity of the bands were determined by densitometry and the proportion of the M/(M+P) species determined. The data shown represent the mean \pm SEM of four independent experiments (* $p < 0.05$). **B.** The same membrane was then incubated with a rabbit anti-calnexin antibody and revealed by autoradiography. The intensity of the bands were determined by densitometry and the proportion of the calnexin/(M+P) species determined. The data shown represent the mean \pm SEM of four independent experiments (* $p < 0.05$).

Figure 5 : Time of interaction between calnexin and W164SV2R following SR121463 treatment. HEK293T cells transiently expressing myc-W164SV2R were incubated in the absence or presence of 10^{-5} M SR121463 for 16 hours. Labelling was carried out with 450 μ Ci/dishes [35 S] methionine/cysteine for 30 minutes, followed by a chase in the continued presence of SR121463 for the indicated times. Sequential immunoprecipitations were carried out with mouse anti-myc antibody and Protein G sepharose followed by agarose-conjugated anti-myc antibody (**A**) or with rabbit anti-calnexin antibody and Protein G sepharose followed by agarose-conjugated anti-myc antibody (**B**), resolved by SDS PAGE and revealed by autoradiography. The deglycosylated degradation intermediate (D), precursor (P) and mature (M) species are

indicated. The panels shown are representative of 3 independent experiments. The intensity of the bands were determined by densitometry and the proportion of the calnexin/(M+P) species determined.

Figure 6 : Dimerization of V2R. HEK293T cells were transiently co-transfected with W164S-Rluc or WT-Rluc V2R along with increasing amount of W164S-GFP10, WT-GFP10 or GABABR2-GFP10 and incubated in the absence or presence of 10^{-5} M SR121463 for 16 hours. Cells were then washed and transferred to 96-well plates. The energy transfer was initiated by the addition of 5 μ M DeepBlueC to each well and BRET measured in a modified TopCount apparatus. The BRET values were plotted against the ratio of total GFP/Rluc expression level. Data were obtained from four independent experiments and analyzed by non-linear regression using Prism 3.0.

Figure 7 : Subcellular localization of DRiP78 and its interaction with V2R. HEK293T cells were transiently co-transfected with myc-W164S or myc-WT V2R and DRiP78-GFP2. **A.** Cells were then washed extensively, permeabilized and the receptors labelled with a mouse anti-myc antibody. Cells were then fixed and incubated with a Texas red-conjugated secondary antibody to visualize the receptors (red). Direct fluorescence of DRiP78-GFP was detected at 520nm upon excitation at 488nm (green). W164SV2R and DRiP78 images were acquired separately by fluorescence microscopy using a Leica HM IRBE laser-scanning confocal microscope with a 100X oil immersion objective. Colocalization between W164SV2R and DRiP78 was assessed by merging the two images (yellow). The images shown are representative of many fields observed in

two independent experiments. **B.** Surface receptors were detected with mouse anti-myc antibody under non-permeabilized condition, the immunoreactivity revealed with an Texas red-conjugated secondary antibody to visualize the receptors (red). Colocalisation with DRiP78 was done as in A. The images shown are representative of many fields observed in two independent experiments. **C.** The receptors were solubilized, immunoprecipitated with a mouse anti-myc antibody, migrated in a denaturing gel and transfer on a nitrocellulose membrane. Subsequently, the membrane was incubated with a rabbit anti-GFP antibody and revealed by autoradiography. The panels shown are representative of 4 independent experiments.

Figure 8 : Interaction between DRiP78 and W164S or WT V2R following SR121463 treatment. **A.** HEK293T cells were transiently co-transfected with DRiP78-Rluc along with increasing amount of W164S-GFP10 or WT-GFP10 V2R, and incubated in the absence or presence of 10^{-5} M SR121463 for 16 hours. BRET experiments were done as in figure 6. Data were obtained from 7 independent experiments and analyzed by non-linear regression using Prism 3.0. **B.** HEK293T cells were transiently co-transfected with W164S-Rluc or WT-Rluc V2R along with increasing amount of DRiP78-GFP2, and incubated in the absence or presence of 10^{-5} M SR121463 for 16 hours. BRET experiments were done as in figure 6. Data were obtained from 6 independent experiments and analyzed by non-linear regression using Prism 3.0.

Figure 9 : Effect of overexpression of DRiP78 on V2R trafficking. HEK293T cells transiently transfected with myc-W164S or myc-WT V2R along with different

concentration of DRiP78-GFP2. **A. and C.** The receptors were solubilized, immunoprecipitated with a mouse anti-myc antibody, migrated in a denaturing gel and transfer on a nitrocellulose membrane. The membrane was then incubated with a mouse preoxydase-conjugated anti-myc antibody and revealed by autoradiography. The intensity of the bands was determined by densitometry. The data shown represent the mean \pm SEM of 4 independent experiments (* $p < 0.05$). **B. and D.** AVP-stimulated cAMP accumulation was measured in HEK293T cells transiently expressing the myc-W164S or myc-WT V2R along with different concentration of DRiP78-GFP as in figure 2. Data are expressed as $[^3\text{H}]\text{cAMP}/([^3\text{H}]\text{ATP}+[^3\text{H}]\text{cAMP})$ and represent the mean \pm SEM of 3 independent experiments (* $p < 0.05$).

Figure 1

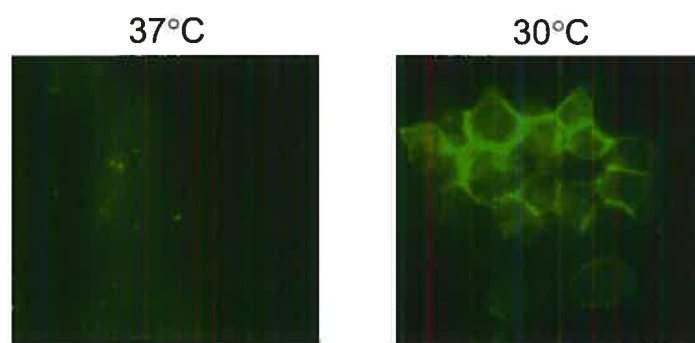


Figure 2

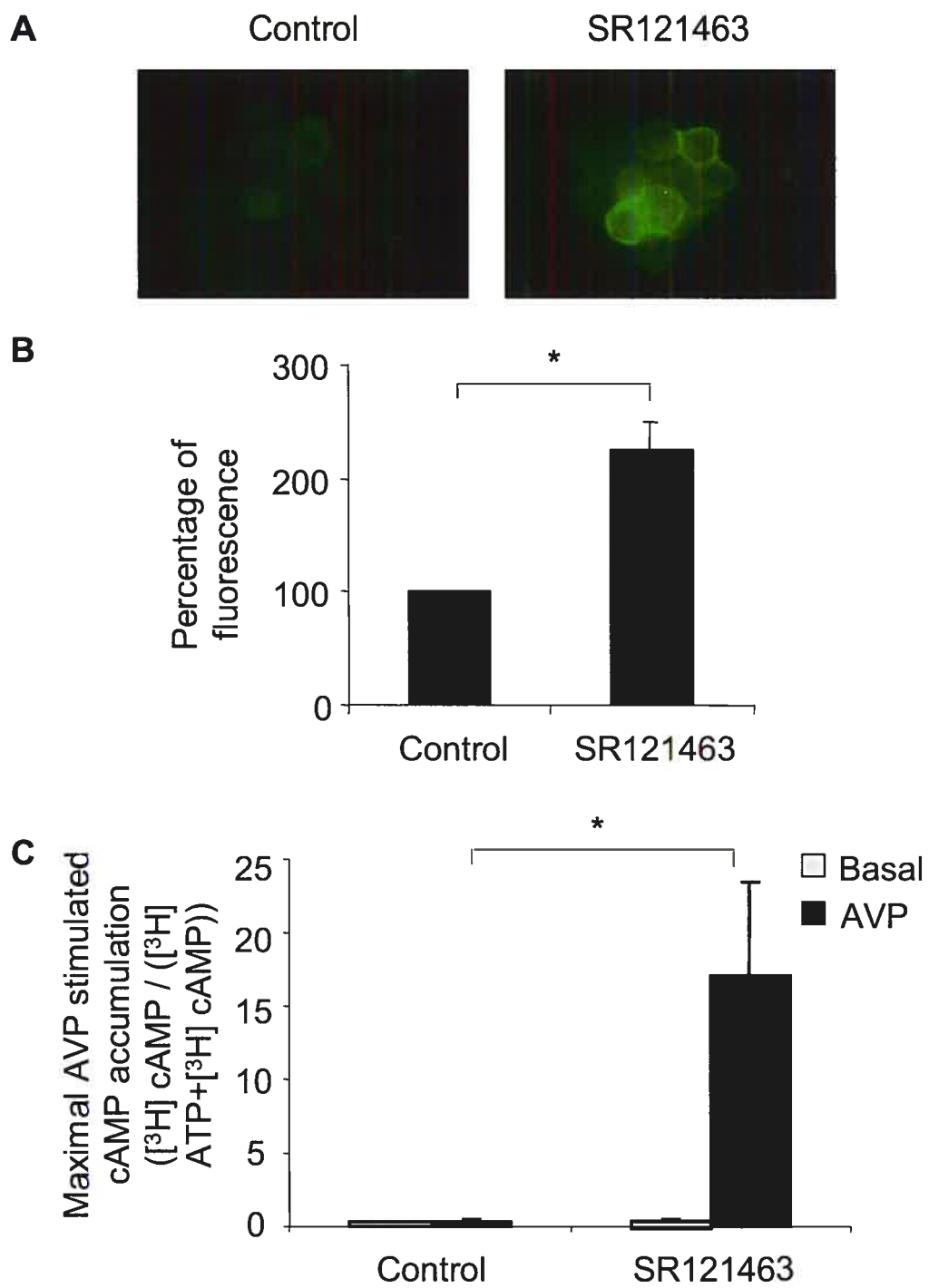


Figure 3

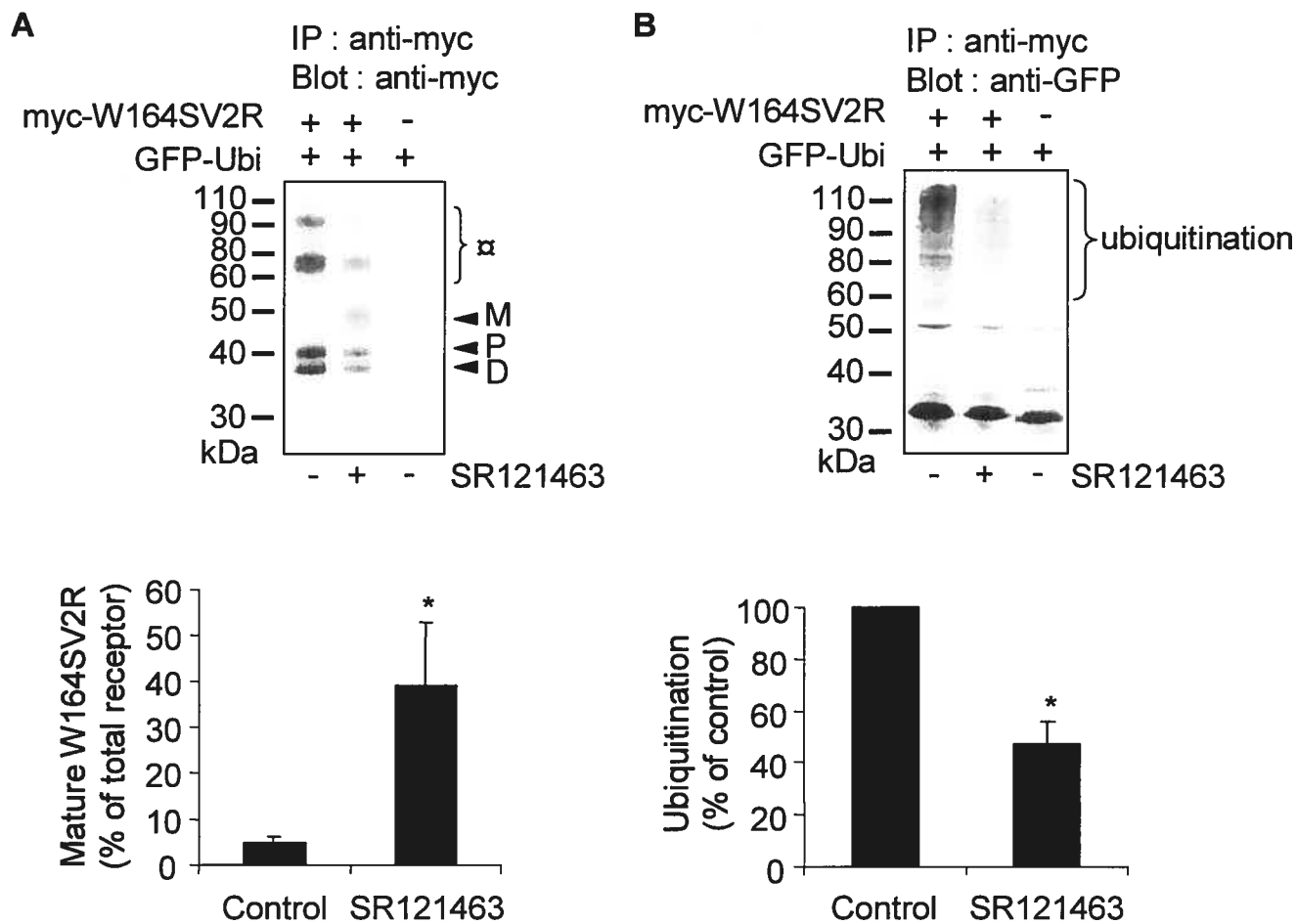


Figure 4

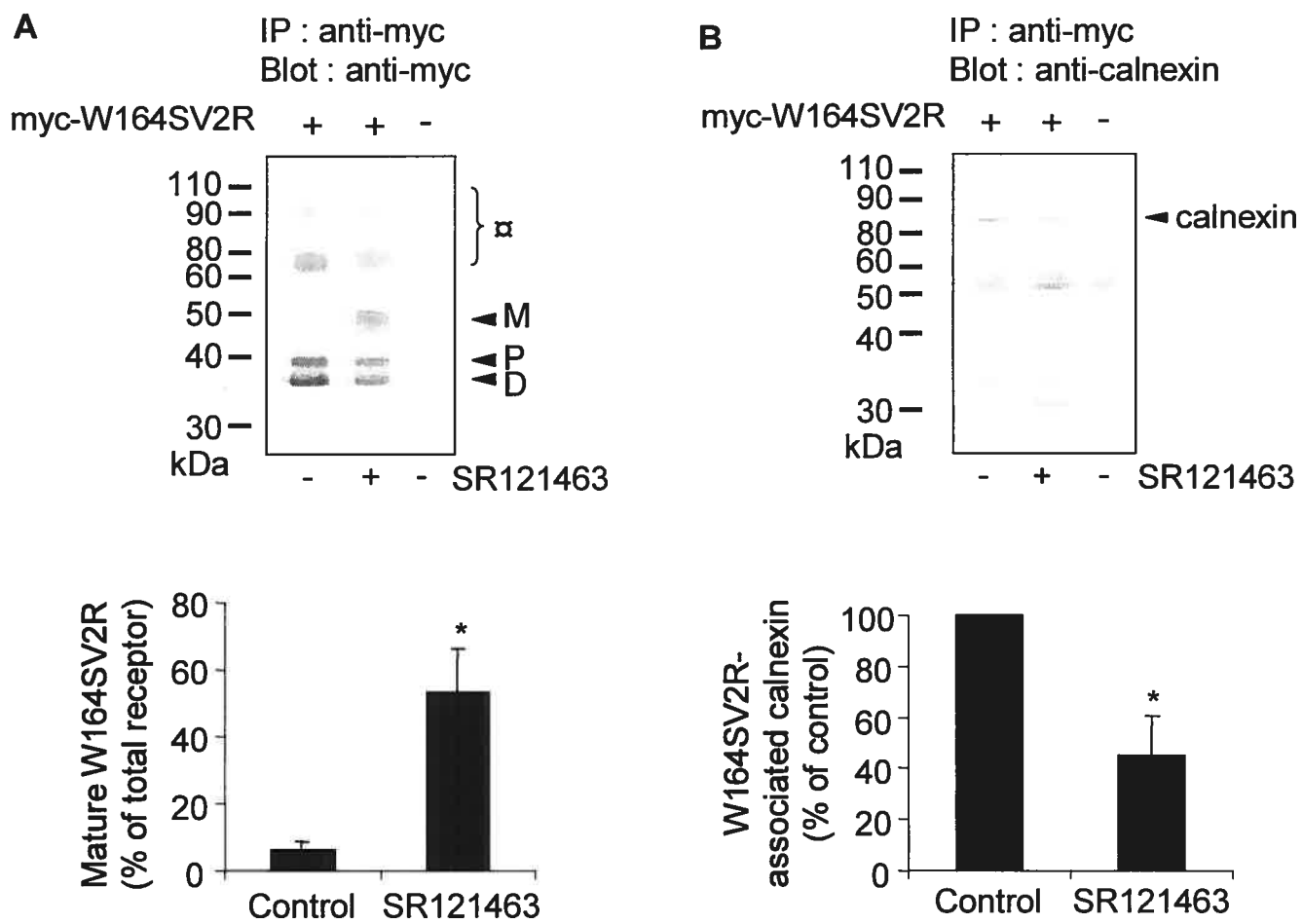


Figure 5

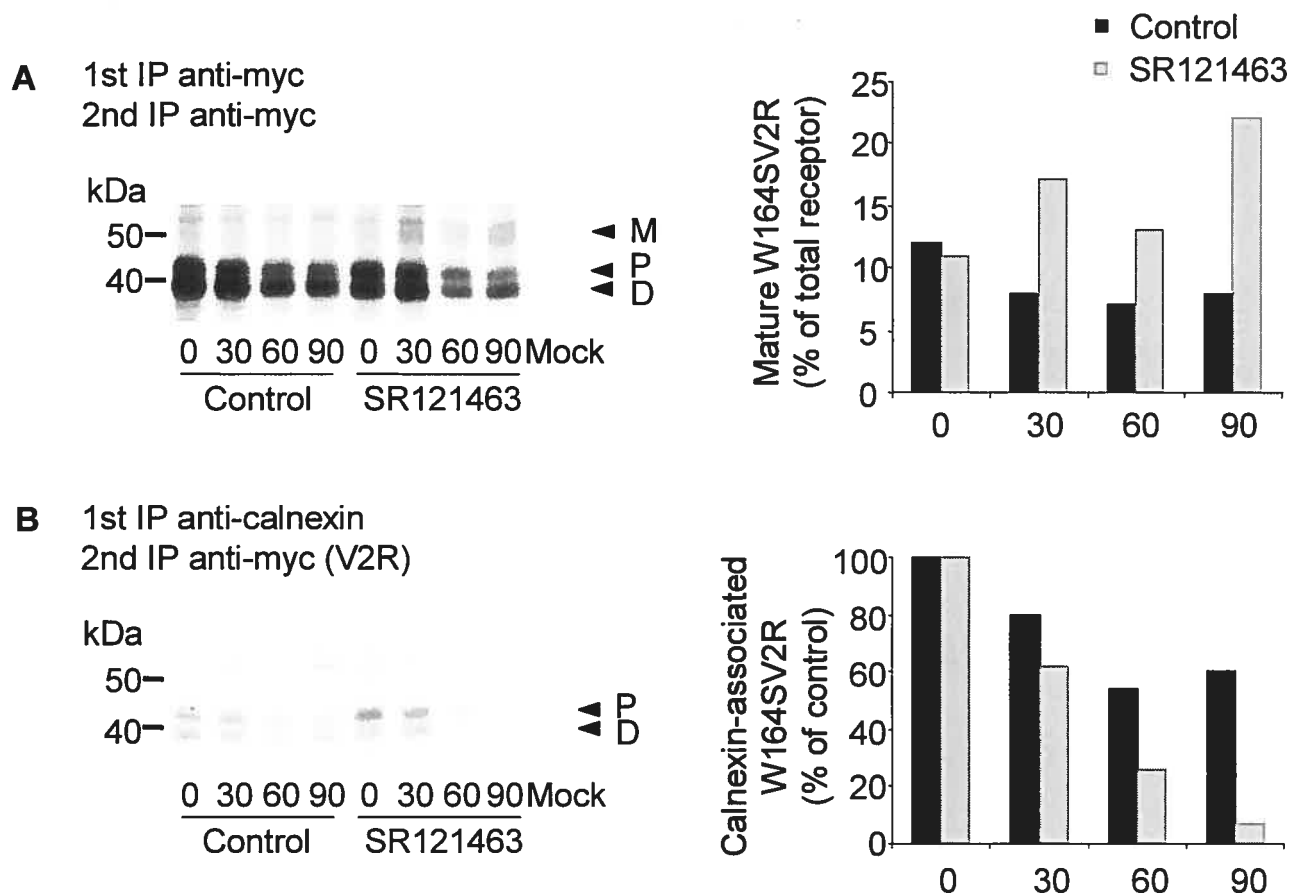


Figure 6

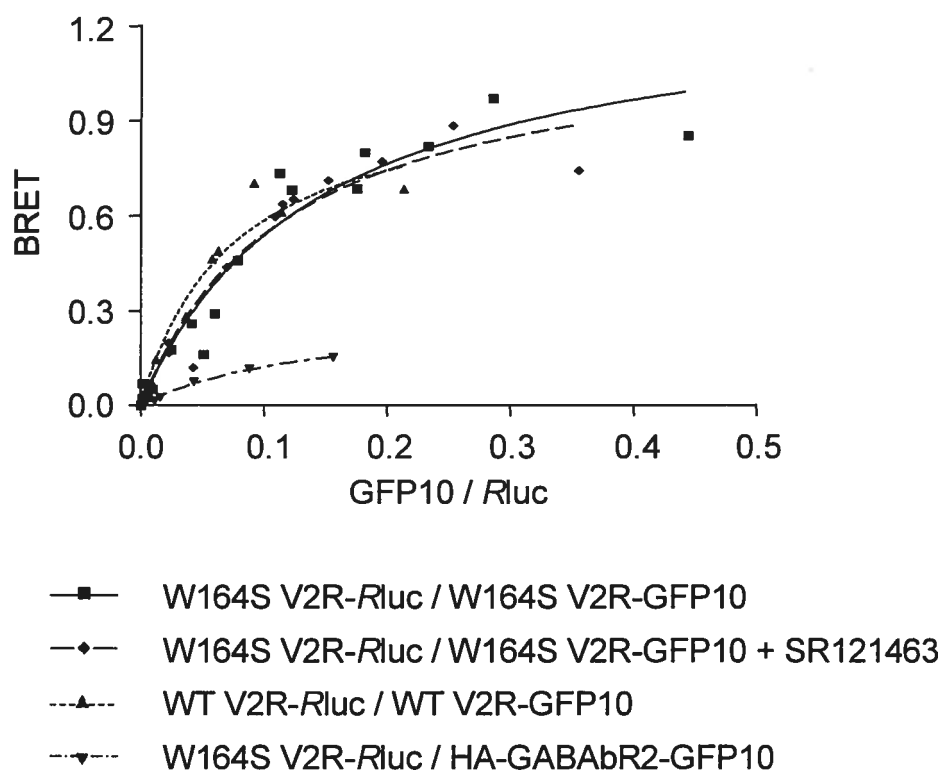


Figure 7

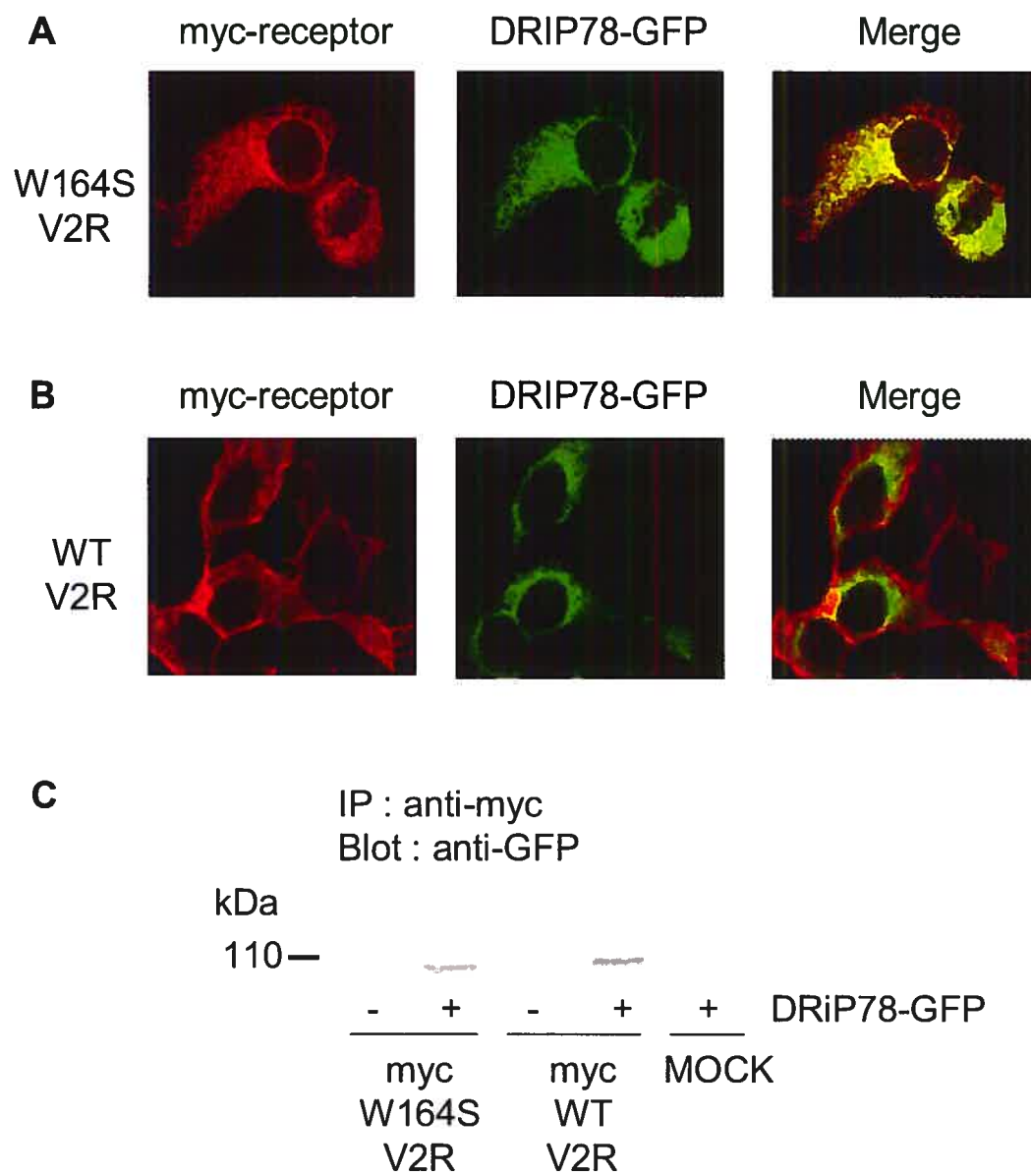


Figure 8

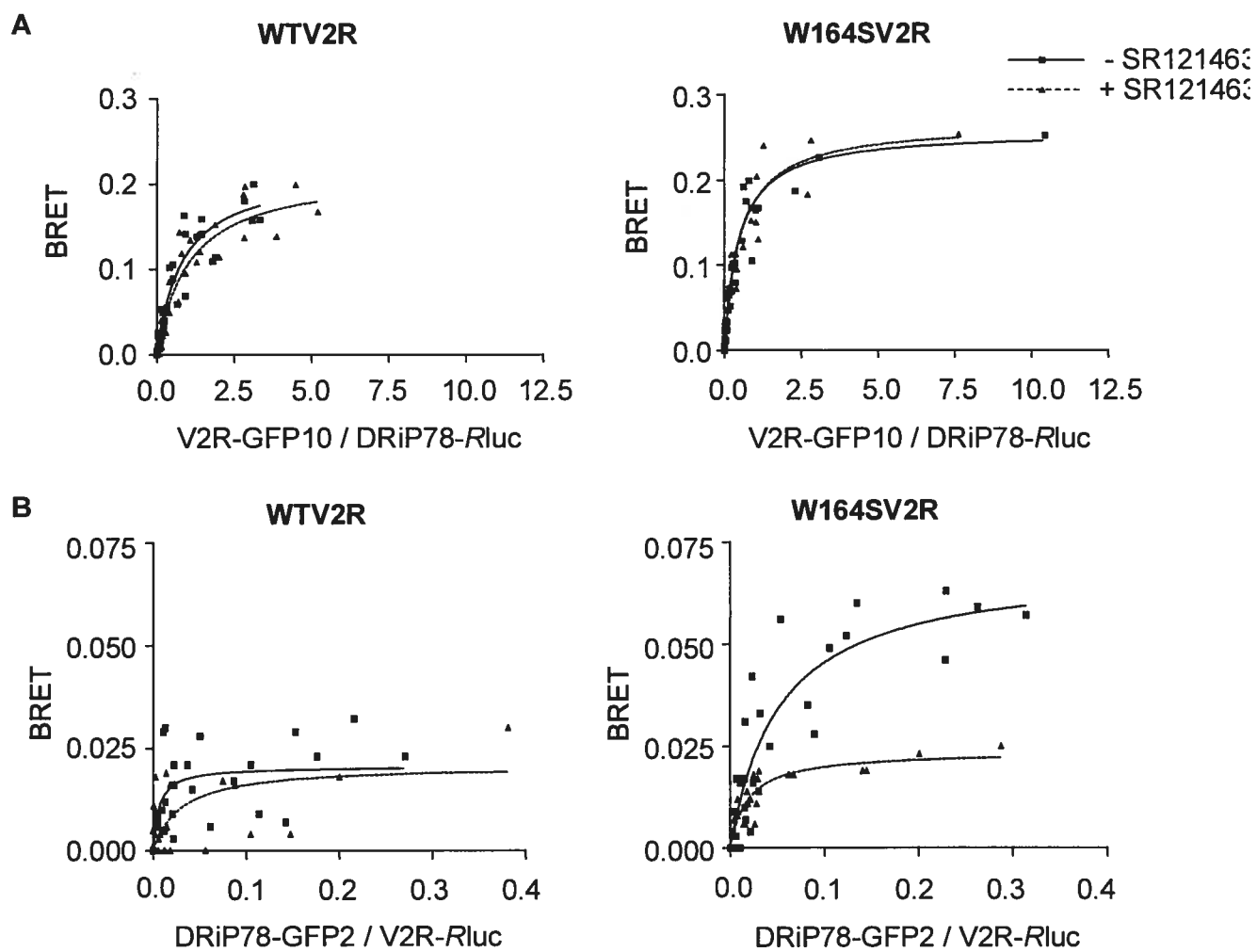
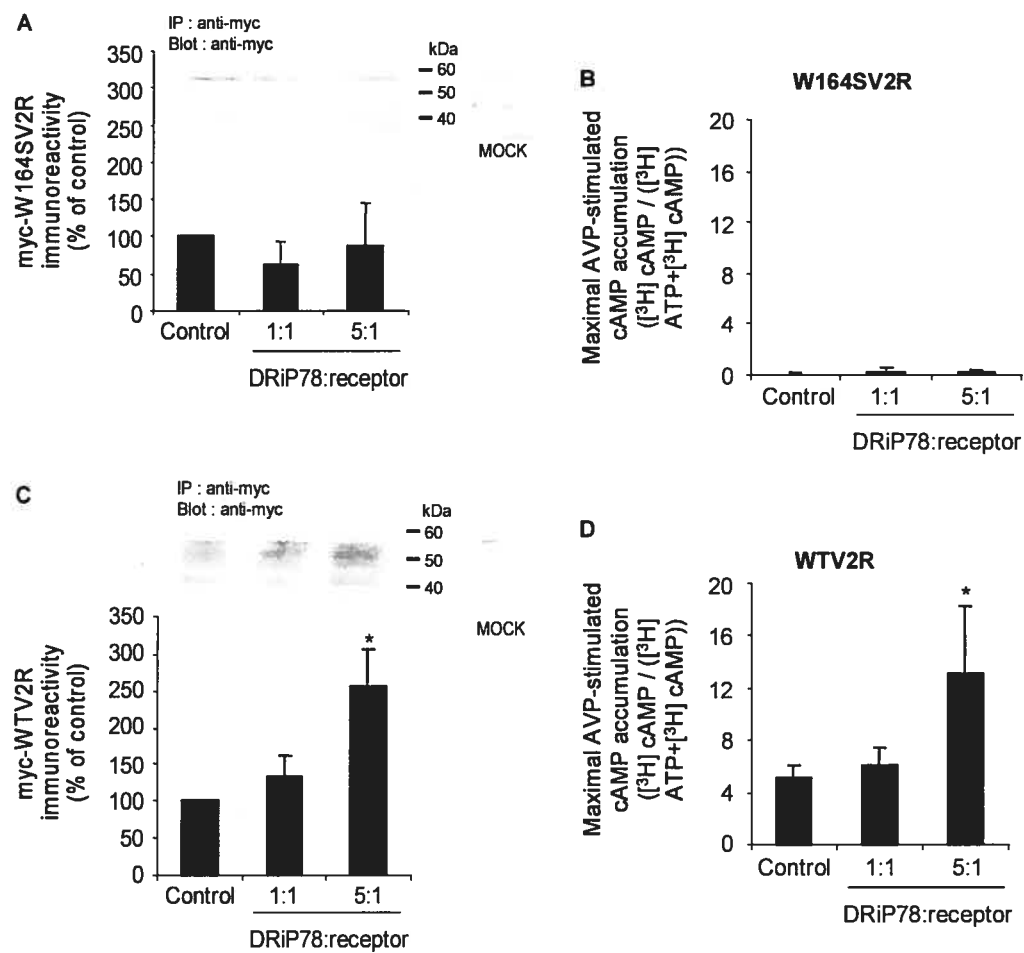


Figure 9



6.3 Troisième article

Pharmacological chaperones as a potentiel treatment for X-linked nephrogenic diabetes insipidus

Virginie Bernier, Jean-Pierre Morello, Alexandro Zarruk, Michèle Loneran, Marie-Françoise

Arthus, Ali Salahpour, Nicolas Debrand, André Laperrière, Rémi Brouard, Robert

Desjardins, Michel Bouvier et Daniel G. Bichet

Manuscrit en revision pour resoumission au New England Journal of Medicine

2004

L'article intitulé "Pharmacological chaperones as a potential treatment for X-linked nephrogenic diabetes insipidus" discute de l'effet thérapeutique potentiel des chaperons pharmacologiques chez des patients atteints de diabète insipide néphrogénique.

Afin de tester le traitement potentiel des chaperons pharmacologiques chez des patients, nous avons utilisé le SR49059, un antagoniste non-peptidique des récepteurs V1a de la vasopressine, puisque cet antagoniste déjà en étude clinique pour le traitement de l'hypertension avait préalablement réussi les tests de toxicologie et était donc sécuritaire. De plus, le fait que la vasopressine soit 100 fois plus affine pour les récepteurs V2 de la vasopressine que le SR49059 suggère que cet antagoniste serait un bon candidat puisqu'il serait plus facile à dissocier du récepteur une fois à la membrane.

Pour ce faire, nous avons d'abord démontré que le SR49059 peut réchapper l'expression à la surface cellulaire et la fonction de récepteurs V2 mutants (del62-64, R137H et W164S) dans un système cellulaire. Par la suite, nous avons testé le potentiel thérapeutique du SR49059 sur 5 patients portant les mutations del 62-64, R137H ou W164S. Dans les 5 cas, un traitement de 2 jours avec le SR49059 a permis une récupération de la fonction rénale, indiquée par une diminution du volume urinaire et une augmentation de l'osmolalité urinaire. L'ensemble de ces résultats propose que le SR49059 pourrait agir comme un chaperon pharmacologique dans la récupération de la fonction rénale observée chez les patients.

Ces résultats offrent une nouvelle voie thérapeutique pour le diabète insipide néphrogénique ainsi que plusieurs autres maladies conformationnelles.

PHARMACOLOGICAL CHAPERONES AS A POTENTIAL TREATMENT FOR X-LINKED NEPHROGENIC DIABETES INSIPIDUS

Misfolding in nephrogenic diabetes insipidus

Virginie Bernier*, Ph.D. Student, Jean-Pierre Morello*, Ph.D., Alexandro Zarruk, M.Sc. student, Michèle Lonergan, M.Sc., Marie-Françoise Arthus, Ph.D., Ali Salahpour, Ph.D. Student, Nicolas Debrand, M.Sc. student, André Laperrière, M.Sc., Rémi Brouard, M.D., Robert E. Desjardins, M.D., Michel Bouvier, Ph.D., Daniel G. Bichet, M.D.

From the Department of Biochemistry (V.B., J.-P.M., A.L., A.S., M.B.), Department of Medicine, Université de Montréal, and Unité de recherche clinique, Centre de recherche et Service de néphrologie, Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal (A.Z., N.D., M.L., M.-F.A., D.G.B.); le Groupe de recherche sur le système nerveux autonome, Université de Montréal (V.B., J.-P.M., A.S., M.B., D.G.B.); Sanofi-Synthelabo Recherche, Paris, France (R.B.) and Yamanouchi Pharma America, Inc., Paramus, NJ, USA (R.E.D.)

*These authors contributed equally to this work.

Address correspondence to: Dr. Daniel G. Bichet

Centre de recherche, Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal
5400, boul. Gouin Ouest
Montréal (Québec) H4J 1C5 Canada

Tel.: (514) 338-2486 Fax: (514) 338-2694

Supported by grants MOP 8126 from the Canadian Institutes of Health Research (D.G.B.) and from the Kidney Foundation of Canada. (D.G.B. and M.B.) and la Fondation J. Rodolphe-La Haye (D.G.B.). J.P.M. was supported by a studentship from the MRC/PMAC Health Program, V.B. is supported by a studentship from the Quebec Society of Hypertension, the Heart and Stroke Foundation of Canada and the Fonds de Recherche en Santé du Québec. A.S. is supported by a studentship from the Canadian Institute for Health Research. M.B. holds a Canada Research Chair in Molecular and Cellular Pharmacology. D.G.B. is a chercheur de carrière of le Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

ABSTRACT

Background In many mendelian diseases, some mutations result in the synthesis of misfolded proteins that cannot reach a transport-competent conformation. In X-linked nephrogenic diabetes insipidus, most of the mutant vasopressin V2 receptors (AVPR2) are trapped in the endoplasmic reticulum and degraded. They are unable to reach the plasma membrane and promote water reabsorption through the principal cells of the collecting ducts.

Methods We are reporting two types of experiments: *in vivo* studies to assess clinically a short-term treatment with a non-peptide AVPR2 antagonist and *in vitro* studies in cultured cell systems.

Results In patients, SR49059 decreased 24-hour urine volume (11.9 ± 2.3 L to 8.2 ± 2.0 L, $p < 0.005$) and water intake (10.7 ± 1.9 L to 7.2 ± 1.6 L, $p < 0.05$). Maximal increase in urine osmolality was observed on day 3 (104 ± 8 mOsm/kg to 147 ± 38 mOsm/kg, $p = 0.05$). Na, K, creatinine excretions and plasma sodium were constant throughout the study. *In vitro* studies indicate that two non-peptide vasopressin receptors antagonists SR49059 and YM087 rescued cell surface expression and function of mutant V2 receptors. Nonsense mutations were not affected by the treatment.

Conclusions Misfolded vasopressin V2 receptor mutants were rescued *in vitro* and also *in vivo* by non-peptide antagonists. This therapeutic approach could be applied to the treatment of several hereditary diseases resulting from errors in proteins folding and kinesis.

Keywords: Pharmacological rescue of misfolded vasopressin V2 receptor mutants. X-linked nephrogenic diabetes insipidus. Non-peptide vasopressin receptor antagonists. Pharmacological chaperones.

ALTHOUGH the activities of the protein synthesis quality control systems are generally advantageous to the cell, on occasion this stringent monitoring process can lead to intracellular retention of salvageable proteins. In recent years, it has been observed that a group of diseases stem from mutations that promote such retention and are collectively referred to as conformational diseases ¹. Nephrogenic diabetes insipidus (NDI) ², which is characterized by a loss of arginine-vasopressin (AVP)-mediated antidiuresis, is one of these diseases. In congenital NDI that results from mutations in the *AVPR2* gene that encodes the V2 vasopressin receptor (V2R) most missense mutations are misfolded, trapped in the endoplasmic reticulum and unable to reach the basolateral cell surface to engage the circulating antidiuretic hormone, arginine-vasopressin ³⁻¹⁰.

The natural history of untreated X-linked NDI includes hypernatremia, hyperthermia, mental retardation and repeated episodes of dehydration in early infancy ^{11, 12}. We and others initially thought that close monitoring of infants diagnosed pre- or perinatally with *AVPR2* mutations, would not only prevent episodes of dehydration but also would permit close to normal growth and development. Although a low sodium diet and distal tubule diuretics prescribed to these patients may achieve a 20-30% decrease in urine output, ¹³ the low sodium diet is difficult to follow and affected children continue to drink large amount of water. Due to a physiological gastro-oesophageal reflux and to the large amount of water in their stomach, these children often vomit and, as a consequence, their nutritional intake is not optimal. There is therefore a need for a safe further reduction in urine output. We recently used pharmacological compounds to rescue misfolded mutant V2 receptors by demonstrating in cultured cells that the non-peptide V2 specific antagonists SR121463 and VPA-985 increased cell surface expression and rescued the

signalling activity of seven naturally occurring *AVPR2* mutations (185-193del, L59P, L83Q, Y128S, S167L, A294P, and P322H) responsible for NDI by promoting their proper folding and maturation ¹⁴. These results suggested that such chaperoning of the receptor could represent a pharmacological treatment for conformational diseases such as NDI. Here, we conducted a short-term trial to test the effect of a non-peptide V2 antagonist on decreasing urine output and increasing urine osmolality in patients with X-linked NDI. We used SR49059, a V1 receptor antagonist previously tested in normal volunteers and patients with putative vasopressin-excess related disorders ^{15, 16}. In addition, *in vitro* studies were done to rescue plasma membrane and signalling of a number of mutant V2R with SR49059 and YM087 a mixed V1-V2 antagonist ¹⁷⁻¹⁹.

METHODS

Study subjects

We tested 5 adult male patients (weight: 83.5 ± 3.9 kg) with X-linked NDI bearing the following *AVPR2* mutations previously identified by sequencing: one 20 y.o. with 185-193del ²⁰, 3 patients, 20, 41, and 42 y.o. with R137H ²¹; one 21 y.o. with W164S ²⁰. All had a documented lifelong history of polyuria and polydipsia and extensive prior testing demonstrated a lack of urinary osmolality response to AVP or dDAVP. Two patients were being treated with hydrochlorothiazide which was discontinued for one week prior to the study.

SR49059 administration for 2 days

Patients were tested at the Clinical Research Unit of the Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal and received a constant Na, K, osmotic and caloric diet for the 3 days of the

study. A dietician met the patients prior to the study and made a detailed evaluation of their usual diet over the past month. This diet was reproduced for the 3 days of the study. None of these patients followed a sodium restricted diet. The dietician also enforced the same diet throughout the study. Water intake was not restricted and was recorded during the 3 days of the study. After 24-hour control measurements (day 1, no medication), SR49059 was administered orally for the next 2 days: on day 2, the patients received 150 mg at 08h00 and 300 mg at 13h00 and 18h00; on day 3, 300 mg at 08h00, 13h00 and 18h00. Blood pressure and pulse were measured every 30 minutes from 08h00 to 24h00 for the first 2 patients and every 2 hours for the last 3 patients. Urine volume was obtained by spontaneous voiding every 30 minutes from 08h00 to 24h00. From midnight to 08h00 all urine excretion was measured at unspecific times.

SR49059 administration for 7 days

Two patients bearing the R137H mutation were also treated 6 weeks later for 7 days with the following dosages of SR49059: 750 mg on day 1, 900 mg for the following 7 days. Urine and plasma measurements were obtained on day 1, 6 and 9 (post-dosing).

Cell culture studies

V2R mutant expression

Mammalian expression plasmids encoding the wild-type, 12 missense mutations (L59P, L83Q, Y128S, R113W, R137H, W164S, A165D, S167L, I209F, A294P, S315R, P322H0, 2 inframe deletions (185-193del, V279del) or 4 nonsense mutations (W71X, S167X, Q180X, R337X) were transiently or stably transfected in COS-1 or HEK 293 cells, respectively, as previously described ¹⁴.

Immunofluorescence microscopy and flow cytometry

All immunofluorescence and flow cytometry studies were carried out in COS-1 cells and HEK 293 as previously described ¹⁴. Briefly V2R were detected using antibodies directed against the myc- or Ha-epitope that was fused at the N-terminus of the constructs. For microscopy, immunoreactivity was assessed using secondary Oregon-green conjugated anti-mouse antibodies. For flow cytometry the phycoerythrin conjugated anti-mouse antibody was used.

cAMP accumulation

Total cAMP accumulation was measured in COS-1 cells and HEK 293 by assessing the transformation of [³H] ATP into [³H] cAMP as described previously ²².

RESULTS

Patient studies:

Safety and efficacy of SR49059 administration in adult patients bearing the 185-193del, R137H or W164S mutations

No significant changes in blood pressure and pulse were encountered throughout the study and no untoward clinical or biochemical abnormalities were observed.

SR49059 decreased 24-hour urine volume (11.9 ± 2.3 L to 8.2 ± 2.0 L, $p < 0.005$) and 24-hour water intake (10.7 ± 1.9 L to 7.2 ± 1.6 L, $p < 0.05$). A maximal increase in urine osmolality was observed from 14h00 to 20h00 on day 3 (104 ± 8 mOsm/kg to 147 ± 38 mOsm/kg, $p = 0.05$) (Fig. 4). Intake and output, plasma Na and K and 24-hour urine osmolar excretion, Na, K and creatinine excretion are presented in Table 1. Plasma sodium was constant indicating that the changes in urine volume and water intake were

secondary to the SR49059 administration and not to voluntary decrease in water intake that would have led to increased plasma sodium. Individual urine volume and urine osmolality responses are presented for patients bearing each of the mutation (Fig. 5, 6 and 7). To various extent, the treatment significantly decreased urinary output and increased urine osmolality in all patients.

Longer treatment was tested for two patients bearing the R137H mutations. Reduced urine volumes and increased urine osmolalities were maintained for the 7 days length of the treatment with R49059 (data not shown).

Cell culture studies

SR49059

First the effect of the non-peptide VR antagonist, SR49059, was assessed on cell surface expression and function of two missense (R137H and W164S), one inframe deletion (185-193del) and one nonsense (W284X) mutation. Immunofluorescence microscopy showed that under basal conditions all V2R mutants were poorly expressed at the cell surface of transfected COS-1 cells (Fig. 1 A). A 16-hour treatment with SR49059 increased the plasma membrane targeting of three of the V2R mutants but not the nonsense mutant receptor. Fig. 1B shows the quantitative assessment of the increase in cell surface expression for the 185-193del V2R using flow cytometry. The increased cell surface expression of 185-193del, R137H and W164S V2R mutants after treatment with SR49059 resulted in a significant potentiation of the AVP-mediated cAMP production (Fig. 2A) confirming that SR49059 restored function by acting as a pharmacological chaperone. In contrast, the SR49059 treatment had no effect on AVP-stimulated cAMP accumulation in cells expressing W284X V2R.

Kinetic analysis of the effect of SR49059 on the function of one of the mutant V2R (185-193delV2R) in COS cells is shown in Fig.2B. As can be seen, the potentiation effect peaked at 2 hours post-treatment but was maintained for at least 12 hours after the removal of the antagonist (Fig. 2B) suggesting that the treatment with a non-peptide V2R antagonist is a potential therapeutic strategy. The relatively slow onset of the effect, is consistent with the notion that the drug acts by favouring folding and cell surface trafficking of neosynthesized receptors²³. The modest increase in AVP-stimulated cAMP production observed in control cells during the course of the experiment, most likely reflects accumulation of a small number of 185-193del V2R at the cell surface. The decline observed in both control and treated cells results from the decrease in receptor expression characteristic of transient transfection.

YM087

Since the clinical development of SR49059 was interrupted (*vide infra*), we also tested the ability of YM087, a dual V1a and V2 vasopressin receptor antagonist¹⁸, to rescue cell surface expression and function of 18 naturally occurring V2R mutants in COS-1 cells. As shown in Fig 3, YM087 promoted cell surface expression and potentiated AVP-mediated cAMP production for 10 naturally-occurring mutations tested. As was the case for SR49059, YM087 had no effect on the nonsense mutations selected as negative controls: W284X (Fig. 3), W71X, S167X, Q180X and R337X (data not shown).

DISCUSSION

To date, no specific treatment exists that directly increases urine osmolality in patients with X-linked NDI. Volume contraction and thiazide diuretics, amiloride and indomethacin are only acting indirectly by decreasing the amount of tubular fluid presented to the distal tubule^{24, 25}. Here, we present evidence that non-peptide vasopressin antagonists are potential specific treatments of this disease. It has been argued that the diversity of mutations in NDI may complicate the search for a universal therapeutic strategy for these patients²⁶. However, since 50% of all NDI mutations are missense, the pharmacological chaperone-based therapy could thus represent a potential general treatment of this protein misfolding disease.

We first demonstrated that SR49059, a V1a receptor antagonist that shows moderate affinity for the V2R (275nM)¹⁵, rescued plasma membranes and signalling of the 185-193del, R137H and W164S mutants, a confirmation of previous results obtained with the selective V2R antagonists SR121463A and VPA¹⁴ and other mutant V2R.

In 5 X-linked NDI patients harbouring three different mutations, SR49059 had beneficial effects on urine volume and osmolality starting 3 to 6 hours after administration. This lag in efficacy is compatible with our previous *in vitro* observations¹⁴ demonstrating that the pharmacological chaperones need to permeate the cell, favour folding and promote expression of functional mutant receptors to the cell surface to be active. The fact that nonsense mutation such as W284X and W71X could not be rescued by the antagonist treatment is consistent with such a proposed mode of action. However, one cannot entirely rule out that alternative mechanisms could also contribute to the beneficial effects of SR49059. In particular, it was recently proposed that the R137H mutation causes constitutive endocytosis of those receptors that are targeted to the plasma membrane²⁷. Whether part of the rescue observed for this mutant could result from the antagonist blocking such endocytosis remains to be determined.

Urine osmolality increased by 50% on day 3 from 14h00 to 20h00 and peaks in urine osmolalities of 250 mOsm/kg (Fig. 2) and 450 mOsm/kg (Fig. 3 and 4) were documented. The effects on urine concentration occurred with no change in blood pressure or pulse, an observation consistent with the lack of hemodynamic effect observed in hypertensive patients after the administration of 300 mg of SR49059¹⁶. The excretion of tonomoles being constant (Table 1), doubling urine osmolality will half by 2 the urine output. In patients with a mean urinary output of 12 L/day, a theoretical decrease of urine volume to 6 L/day could be obtained provided that a sustained drug effect could be reached through optimization of the drug regimen.

The proof-of-principle results obtained in the present study indicate that pharmacological chaperone-based therapy could be applied to other missense mutations or inframe

deletions or insertions responsible for X-linked NDI. Among the 169 X-linked NDI families referred to our laboratory (²⁸, and unpublished data) 56 of the 119 different putative disease-causing mutations, are missense mutations potentially amenable to rescue by these pharmacological chaperones.

Unfortunately, the clinical development of SR49059 has been interrupted during the course of these studies due to possible interference with the CYP3A4 metabolic pathway. We thus wanted to test if other vasopressin antagonists, which could be clinically developed, may also act as pharmacological chaperones for NDI causing mutations. Another non-peptide vasopressin receptor antagonist in advanced clinical testing phase with an excellent safety profile for another application ¹⁸, YM087, was found to rescue cell surface expression and function of 10 missense V2R mutants. This provides supporting data that will allow us and others to test this compound and additional vasopressin ligands in patients with X-linked NDI when they become available for such trials.

In addition to be a promising avenue for the treatment of X-linked NDI, stabilization of protein conformation(s), using small cell-permeable ligands may represent a generally applicable rescue strategy for different diseases resulting from improper protein folding and targeting. These diseases include cystic fibrosis, osteogenesis imperfecta, alpha1-antitrypsin deficiency, autosomal recessive nephrogenic diabetes insipidus, Gitelman's syndrome, Fabry's disease and many others ²⁹⁻³⁶.

REFERENCES

1. Carrell RW, Lomas DA. Conformational disease. *Lancet* 1997; 350:134-8.
2. Bichet DG, Fujiwara TM. Nephrogenic diabetes insipidus. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al., eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Vol. 3. New York: McGraw-Hill, 2001:4181-4204.
3. Wenkert D, Schöneberg T, Merendino JJ, Jr., et al. Functional characterization of five V2 vasopressin receptor gene mutations. *Mol Cell Endocrinol* 1996; 124:43-50.
4. Sadeghi H, Robertson GL, Bichet DG, Innamorati G, Birnbaumer M. Biochemical basis of partial NDI phenotypes. *Mol Endocrinol* 1997; 11:1806-1813.
5. Tsukaguchi H, Matsubara H, Taketani S, Mori Y, Seido T, Inada M. Binding-, intracellular transport-, and biosynthesis-defective mutants of vasopressin type 2 receptor in patients with X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *J Clin Invest* 1995; 96:2043-50.
6. Schöneberg T, Yun J, Wenkert D, Wess J. Functional rescue of mutant V2 vasopressin receptors causing nephrogenic diabetes insipidus by a coexpressed receptor polypeptide. *EMBO J* 1996; 15:1283-1291.
7. Ala Y, Morin D, Mouillac B, et al. Functional studies of twelve mutant V2 vasopressin receptors related to nephrogenic diabetes insipidus: molecular basis of a mild clinical phenotype. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9:1861-1872.
8. Oksche A, Schulein R, Rutz C, et al. Vasopressin V2 receptor mutants that cause X-linked nephrogenic diabetes insipidus: analysis of expression, processing, and function. *Mol Pharmacol* 1996; 50:820-8.

9. Pasel K, Schulz A, Timmermann K, et al. Functional characterization of the molecular defects causing nephrogenic diabetes insipidus in eight families. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:1703-10.
10. Morello J-P, Bichet DG. Nephrogenic diabetes insipidus. *Annu Rev Physiol* 2001; 63:607-630.
11. Crawford JD, Bode HH. Disorders of the posterior pituitary in children. In: Gardner LI, ed. *Endocrine and Genetic Diseases of Childhood and Adolescence*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1975:126-158.
12. van Lieburg AF, Knoers NVAM, Monnens LAH. Clinical presentation and follow-up of 30 patients with congenital nephrogenic diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:1958-1964.
13. Earley L, Orloff J. The mechanism of antidiuresis associated with the administration of hydrochlorothiazide to patient with vasopressin-resistant diabetes insipidus. *J. Clin. Invest.* 1962; 41:1988-1997.
14. Morello JP, Salahpour A, Laperrière A, et al. Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants. *J Clin Invest* 2000; 105:887-895.
15. Serradeil-Le Gal C, Wagnon J, Garcia C, et al. Biochemical and pharmacological properties of SR 49059, a new, potent, nonpeptide antagonist of rat and human vasopressin V1a receptors. *J Clin Invest* 1993; 92:224-31.
16. Thibonnier M, Kilani A, Rahman M, et al. Effects of the nonpeptide V(1) vasopressin receptor antagonist SR49059 in hypertensive patients. *Hypertension* 1999; 34:1293-300.

17. Decaux G. Long-term treatment of patients with inappropriate secretion of antidiuretic hormone by the vasopressin receptor antagonist conivaptan, urea, or furosemide. *Am J Med* 2001; 110:582-4.
18. Udelson JE, Smith WB, Hendrix GH, et al. Acute hemodynamic effects of conivaptan, a dual V1a and V2 vasopressin receptor antagonist, in patient with advanced heart failure. *Circulation* 2001; 104:2417-2423.
19. Martinez-Castelao A. Conivaptan (Yamanouchi). *Curr Opin Investig Drugs* 2002; 3:89-95.
20. Bichet DG, Birnbaumer M, Lonergan M, et al. Nature and recurrence of AVPR2 mutations in X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *Am J Hum Genet* 1994; 55:278-286.
21. Bichet DG, Arthus M-F, Lonergan M, et al. X-linked nephrogenic diabetes insipidus mutations in North America and the Hopewell hypothesis. *J Clin Invest* 1993; 92:1262-1268.
22. Wong YH, Federman A, Pace AM, et al. Mutant alpha subunits of Gi2 inhibit cyclic AMP accumulation. *Nature* 1991; 351:63-5.
23. Petaja-Repo UE, Hogue M, Bhalla S, Laperriere A, Morello JP, Bouvier M. Ligands act as pharmacological chaperones and increase the efficiency of delta opioid receptor maturation. *Embo J* 2002; 21:1628-37.
24. Hebert SC. Molecular mechanisms. *Semin Nephrol* 1999; 19:504-23.
25. Knoers NV, Monnens LL. Nephrogenic diabetes insipidus. *Semin Nephrol* 1999; 19:344-352.

26. Oksche A, Rosenthal W. The molecular basis of nephrogenic diabetes insipidus. *J. Mol. Med* 1998; 76:326-337.
27. Barak LS, Oakley RH, Laporte SA, Caron MG. Constitutive arrestin-mediated desensitization of a human vasopressin receptor mutant associated with nephrogenic diabetes insipidus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:93-98.
28. Arthus M-F, Lonergan M, Crumley MJ, et al. Report of 33 novel *AVPR2* mutations and analysis of 117 families with X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11:1044-1054.
29. Kuznetsov G, Nigam SK. Folding of secretory and membrane proteins. *N Engl J Med* 1998; 339:1688-95.
30. Burrows JA, Willis LK, Perlmutter DH. Chemical chaperones mediate increased secretion of mutant alpha 1-antitrypsin (alpha 1-AT) Z: A potential pharmacological strategy for prevention of liver injury and emphysema in alpha 1-AT deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:1796-801.
31. Fan JQ, Ishii S, Asano N, Suzuki Y. Accelerated transport and maturation of lysosomal alpha-galactosidase A in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor. *Nat Med* 1999; 5:112-5.
32. Rubenstein RC, Zeitlin PL. A pilot clinical trial of oral sodium 4-phenylbutyrate (Buphenyl) in deltaF508-homozygous cystic fibrosis patients: partial restoration of nasal epithelial CFTR function. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:484-90.
33. Marr N, Bichet DG, Hoefs S, et al. Cell-biologic and functional analyses of five new Aquaporin-2 missense mutations that cause recessive nephrogenic diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:2267-2277.

34. De Jong JC, Van Der Vliet WA, Van Den Heuvel LP, Willems PH, Knoers NV, Bindels RJ. Functional Expression of Mutations in the Human NaCl Cotransporter: Evidence for Impaired Routing Mechanisms in Gitelman's Syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:1442-8.
35. Aridor M, Balch WE. Integration of endoplasmic reticulum signaling in health and disease. *Nat Med* 1999; 5:745-51.
36. Meij IC, Koenderink JB, van Bokhoven H, et al. Dominant isolated renal magnesium loss is caused by misrouting of the Na(+),K(+)-ATPase gamma-subunit. *Nat Genet* 2000; 26:265-6.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank C. Serradeil-LeGal (Sanofi Research) for the generous gift of SR49059, L. Cournoyer and S. Sénéchal for technical assistance, M. Moreau for assistance with the figures, and D. Binette for graphical and secretarial expertise. We also thank Dr. Marc Caron for providing the R137H construction.

Table 1. Water, Na, K intakes and 24-hour urine osmolar excretion, Na, K and creatinine excretion and plasma sodium during day 1 (control) dans SR49059 administration (days 2 and 3).

	Day 1 (control)	Day 2	Day 3	P value (day 1 vs day 2)
Water intake (L/day)	10.7 ± 1.86	10.7 ± 2.2	7.2 ± 1.56	0.028
Na intake (mmol/day)	169.8 ± 3.4	179.4 ± 0.6	194 ± 4.29	NS
K intake (mmol/day)	101.2 ± 6.8	105.8 ± 4.2	107 ± 3.0	NS
Plasma sodium (mEq/L)	141 ± 0.6	140.8 ± 1.8	140.2 ± 2.22	NS
Plasma potassium (mEq/L)	4.02 ± 0.11	3.82 ± 0.05	3.7 ± 0.03	NS
Urine volume (L/day)	11.9 ± 2.3	10.68 ± 2.48	8.23 ± 1.98	0.005
Osmolar excretion (Osm/day)	1068.4 ± 112	996 ± 55	930.7 ± 72	NS
Creatinine excretion (mol/day)	16.85 ± 1.56	15.54 ± 1.94	15.10 ± 1.32	NS
Na excretion (mEq/day)	199.33 ± 20.4	163.9 ± 17	140.9 ± 13.2	NS
K excretion (mEq/day)	71.8 ± 16.5	65.54 ± 6.9	71.0 ± 7.5	NS
Na+K excretion (mEq/day)	271.14 ± 32.4	229.4 ± 16.4	211.97 ± 20	NS

FIGURE LEGENDS

Fig. 1: SR49059 treatment increased cell surface expression of the three NDI mutants. **A)** Immunofluorescence microscopy of non-permeabilized COS-1 cells transiently expressing wild-type, del 62-64, R137H, W164S, and W284X V2R incubated or not for 16h with 10^{-5} M SR49059. **B)** Cell surface receptor expression was measured by flow cytometry analysis (FACS) of cells stably expressing the 185-193del V2R incubated in the absence or presence of 10^{-5} M SR49059.

Fig. 2: Rescued signaling activity of cells following pre-treatment with SR49059. **A)** Potentiation of AVP-stimulated cAMP accumulation was measured in COS-1 cells transiently expressing wild-type, del 62-64, R137H, W164S and W284X V2R following a 10^{-5} M SR49059 pre-treatment of 16h. The results are expressed as absolute values and as fold increase (insert) over the values obtained in cells not treated with SR49059. The value of 1 obtained for the wild-type receptor indicates that the SR49059 is not altering its maximal efficacy. **B)** Duration of the effect of SR49059 pre-treatment on AVP-stimulated cAMP accumulation. HEK 293 cells stably expressing the del 62-64 V2R were treated with 10^{-5} M SR49059 for 16h. At the end of the treatment, the antagonist was removed, the cells washed and the AVP-stimulated cAMP accumulation determined at indicated times following the washing procedures.

Fig. 3: YM087 increased cell surface expression and AVP-stimulated cAMP accumulation of 9 missense and one inframe deleted *AVPR2* mutants.

Fig. 4: Urine volume, urine osmolality and water intake before and after SR49059 administration in 5 adult male patients with X-linked nephrogenic diabetes insipidus.

Fig. 5-7: Urine volume and urine osmolality before (day 1) and after (days 2 and 3) SR49059 administration in individual patients bearing the R137H (Fig. 5) 185-193del (Fig. 6) and W164S (Fig. 7) mutations. Please note the distances observed between the 2 lines on day 2 and 3 representing mirror images of urine volume and osmolality.

Figure 1

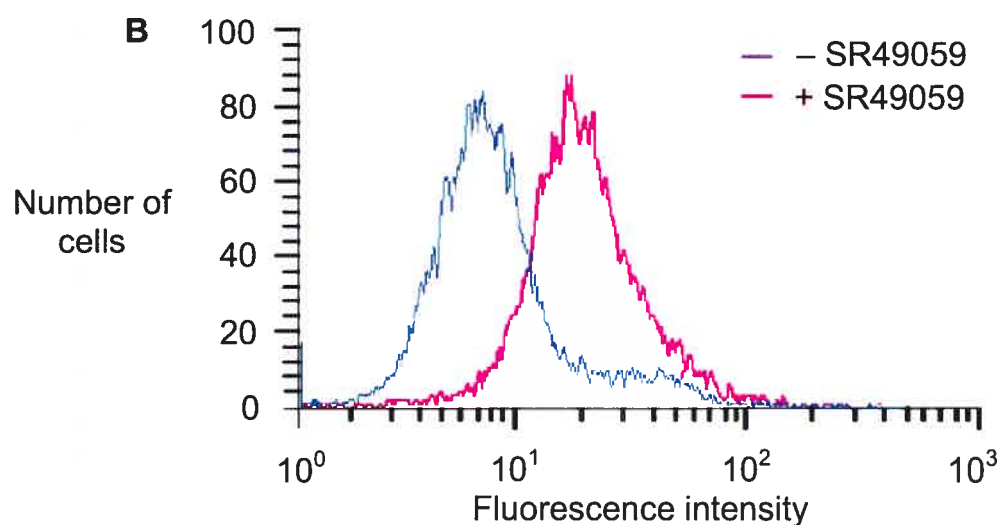
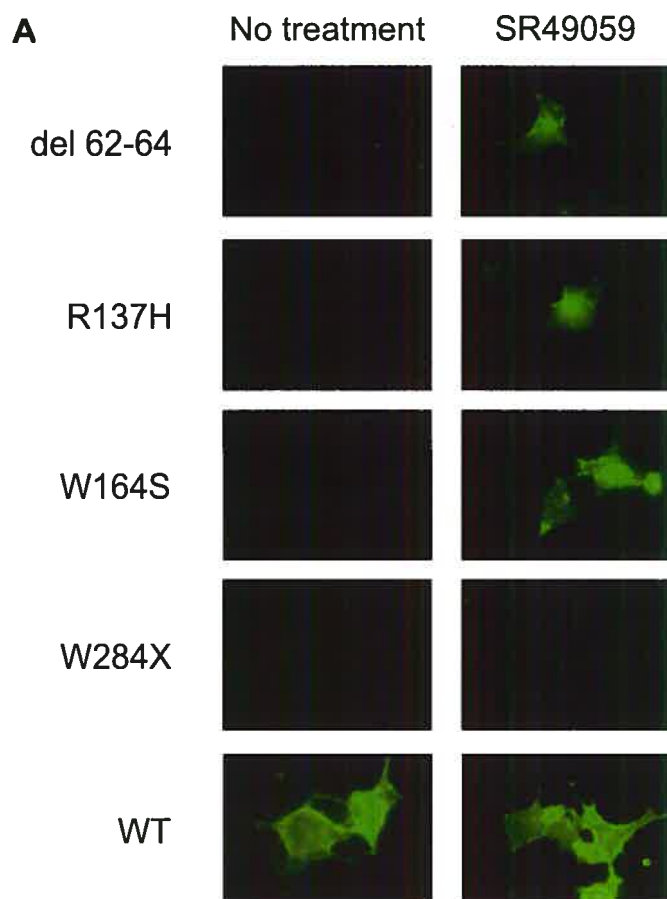


Figure 2

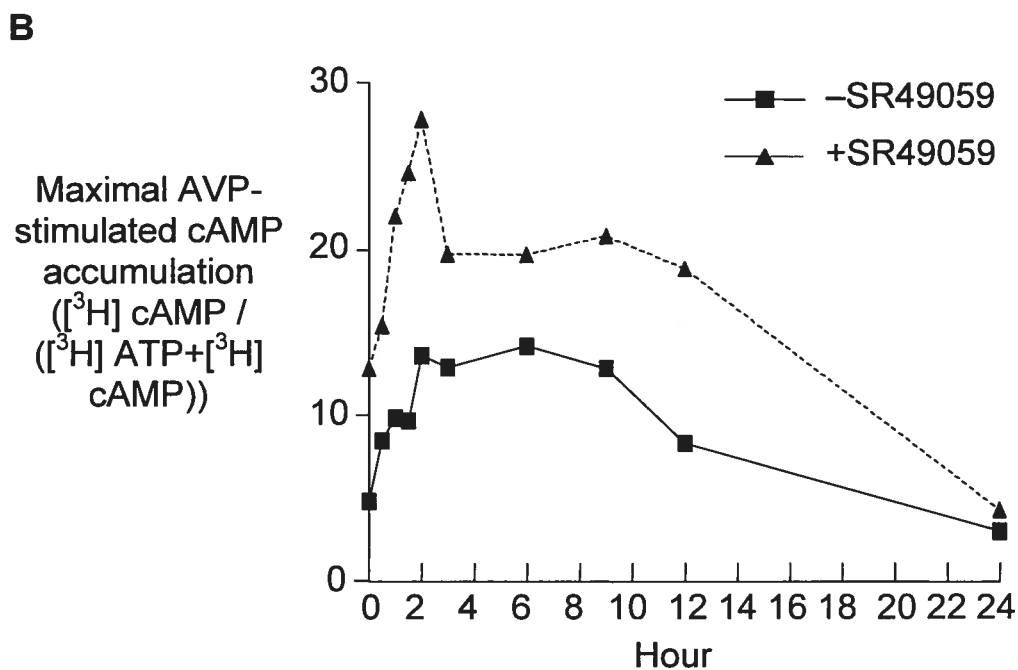
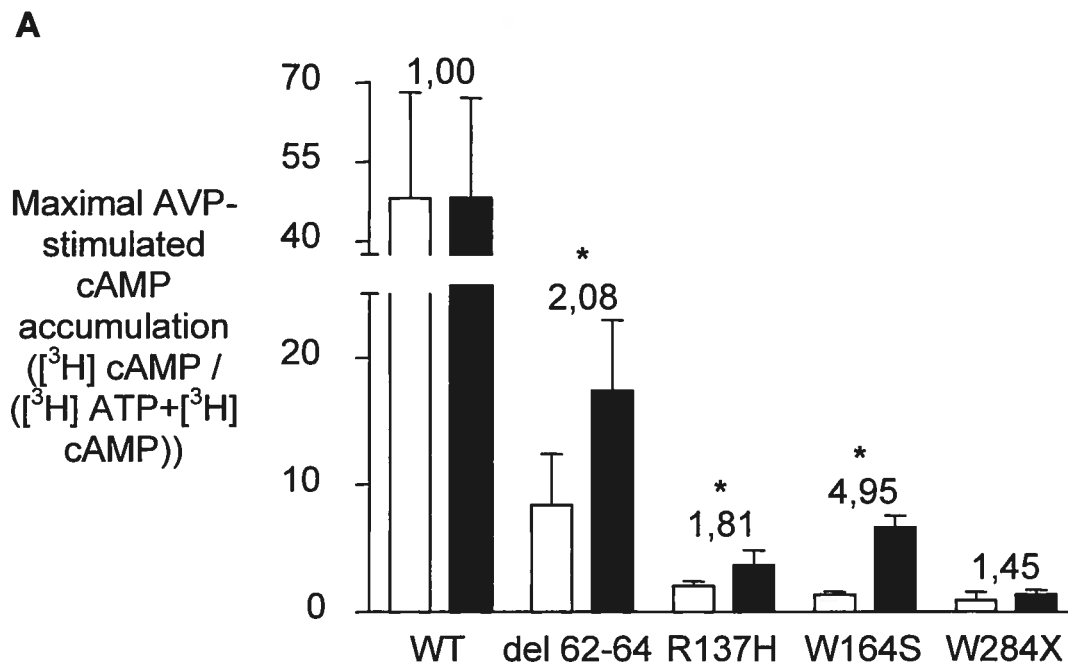


Figure 3

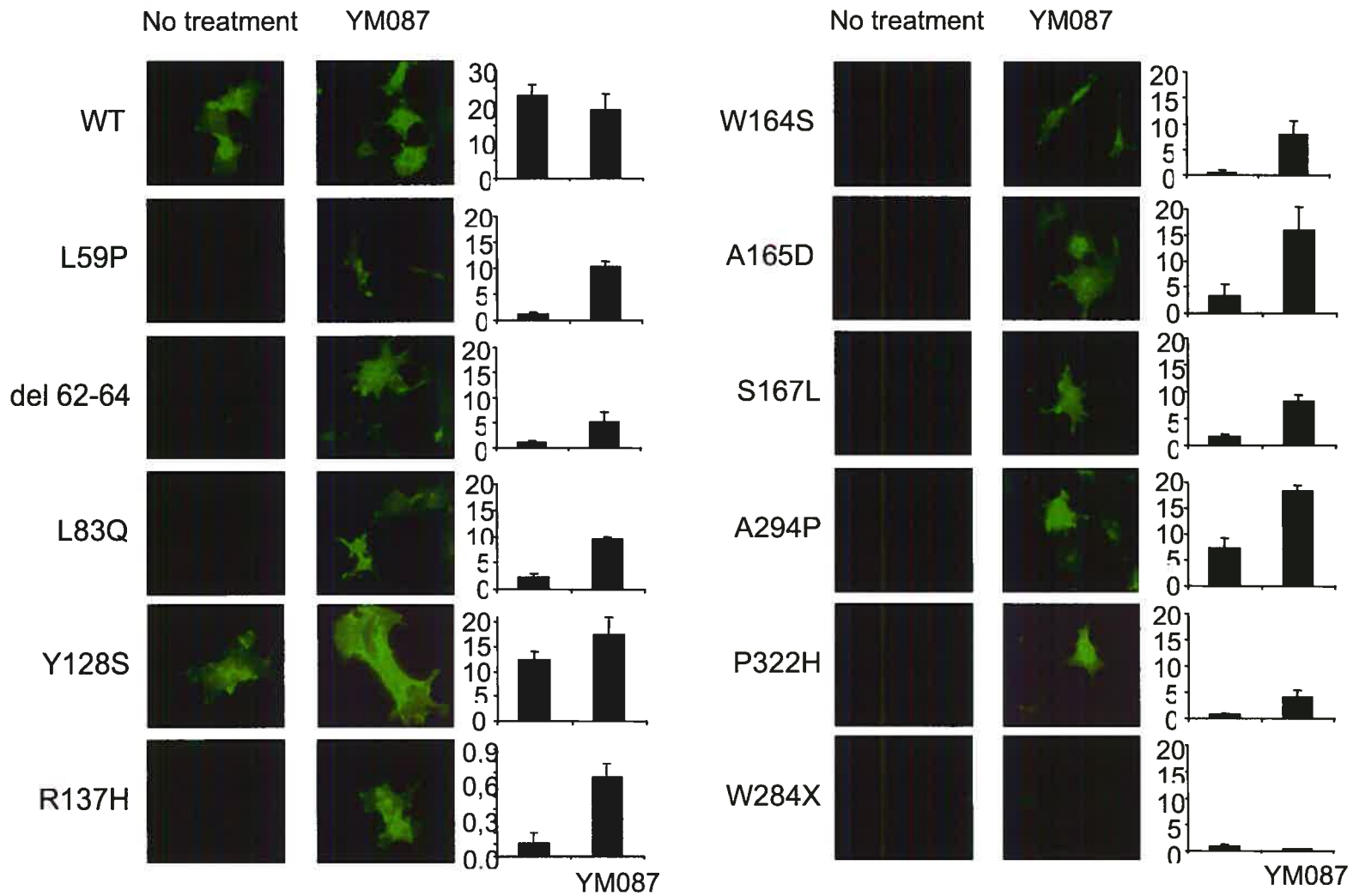


Figure 4

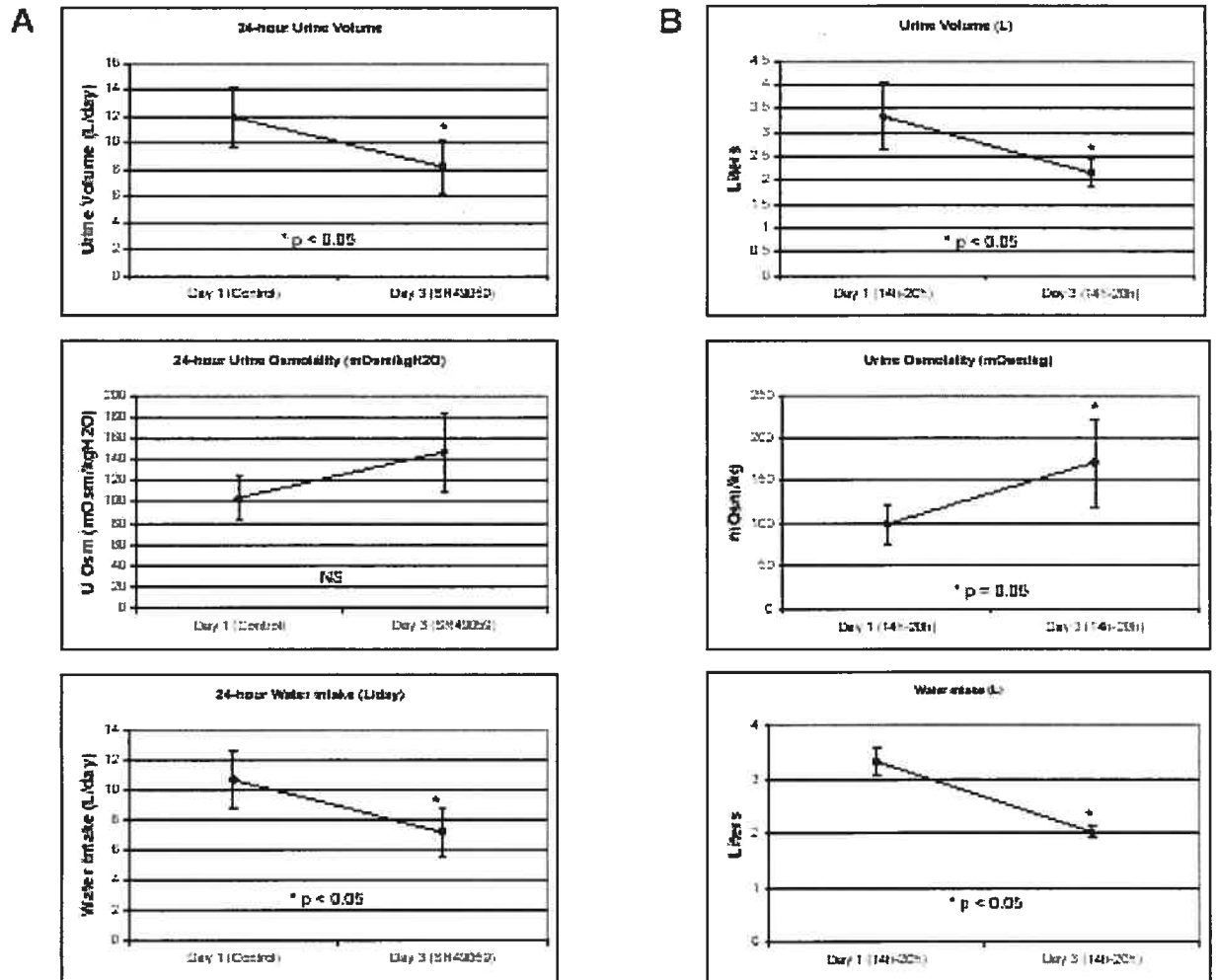


Figure 5

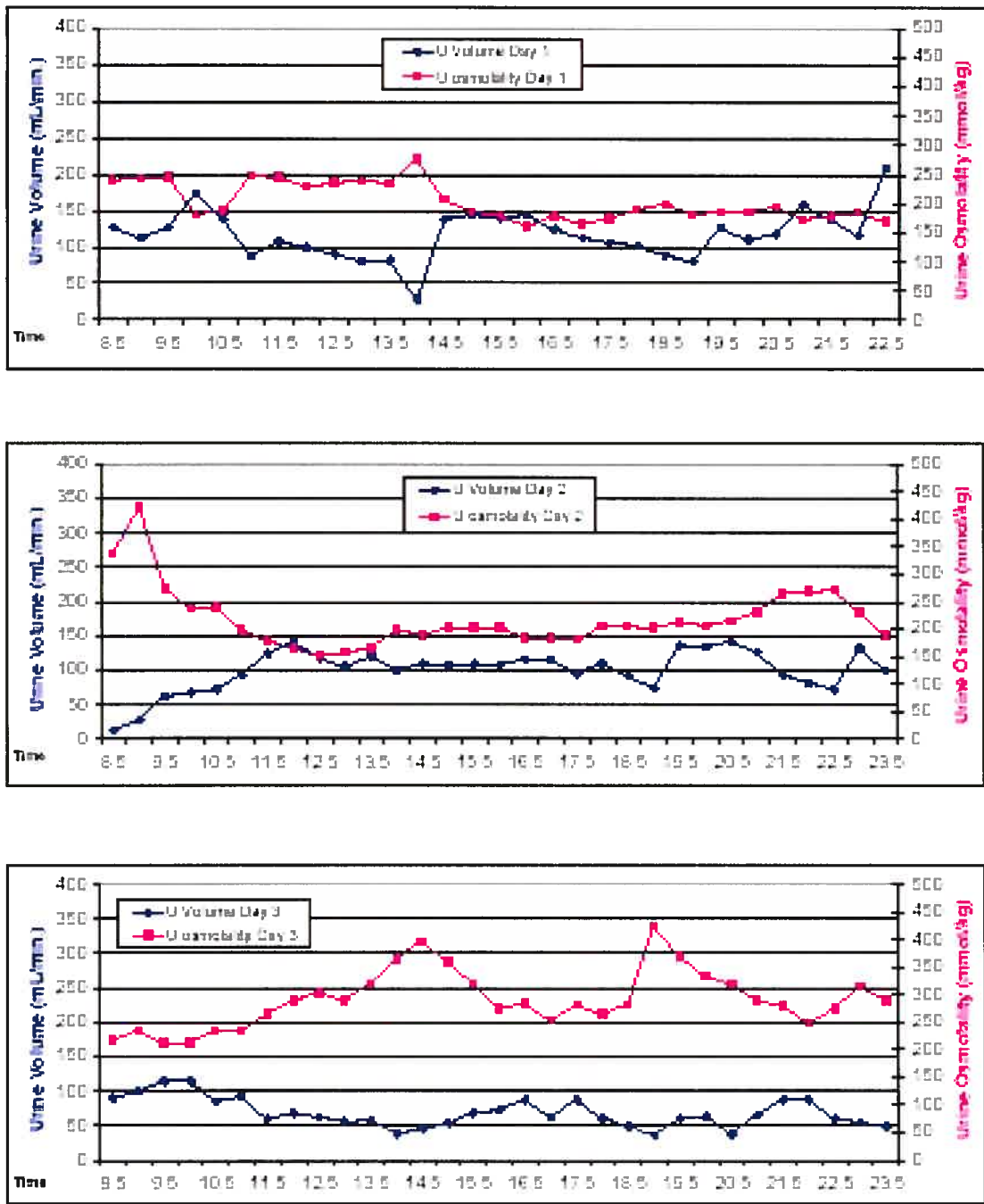


Figure 6

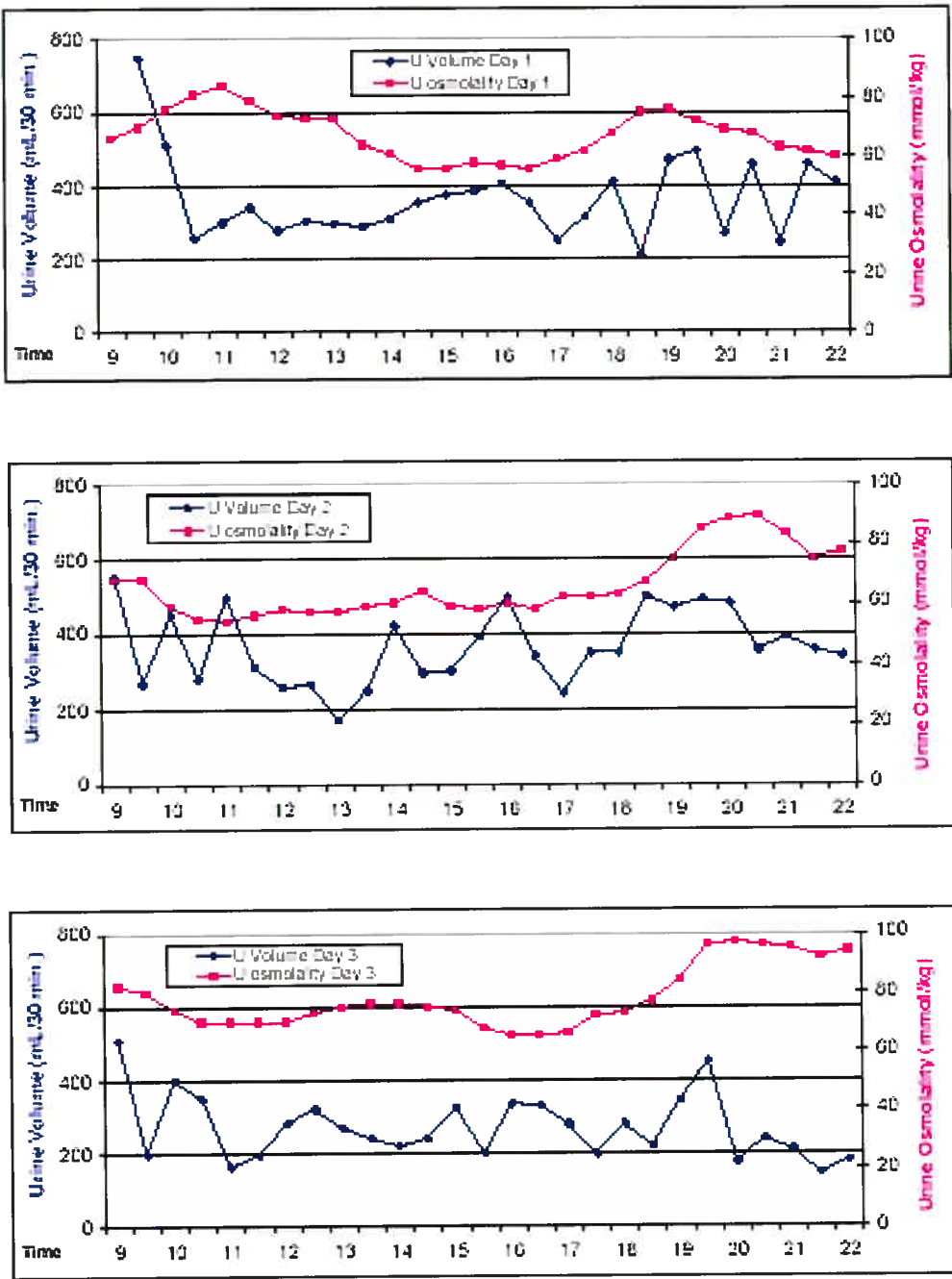
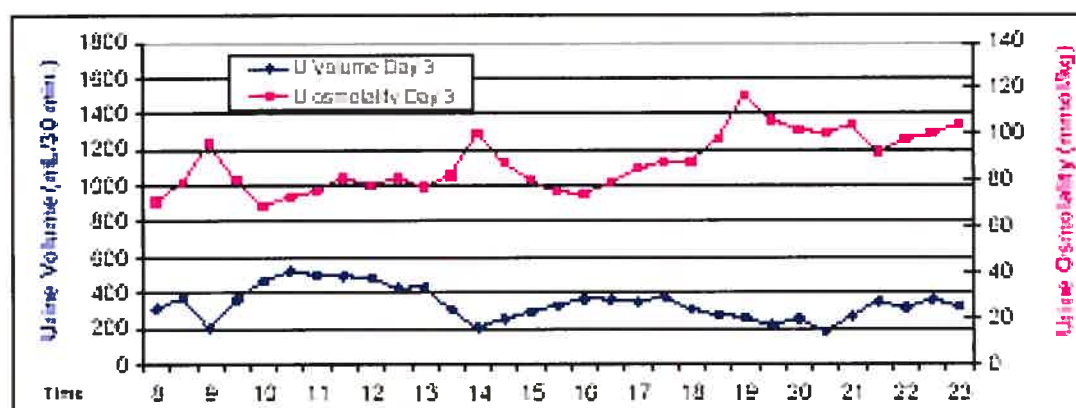
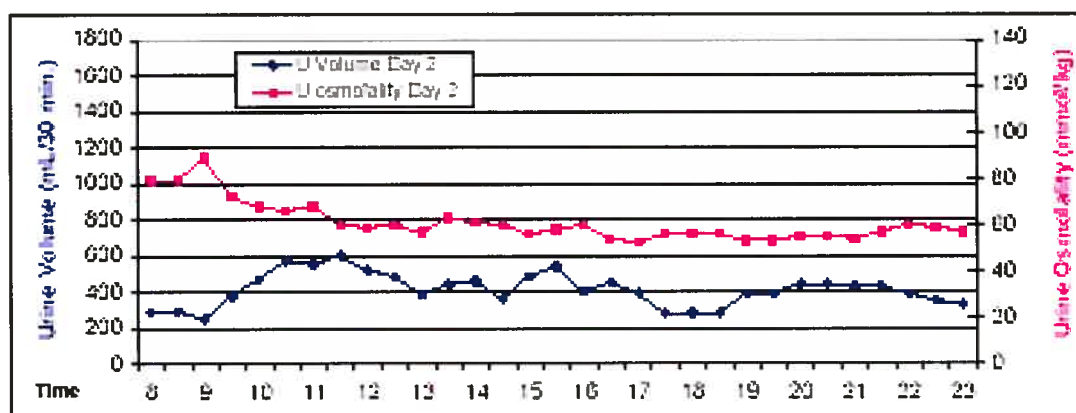
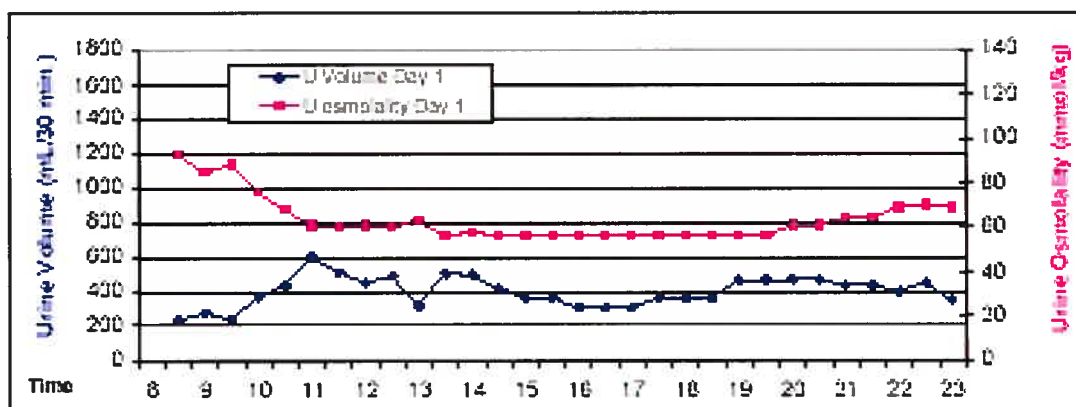


Figure 7



6.4 Quatrième article

**Functional rescue of the constitutively internalized V2
vasopressin receptor mutant R137H by the
pharmacological chaperone action of SR49059**

Virginie Bernier, Monique Lagacé, Michèle Lonergan, Marie-Françoise Arthus,
Daniel G. Bichet et Michel Bouvier

Publié dans Molecular Endocrinology

Août 2004, 18(8), p.2074-2084

L'article intitulé "Functional rescue of the constitutively internalized V2 vasopressin receptor mutant R137H by the pharmacological chaperone action of SR49059" démontre la récupération fonctionnelle des récepteurs V2 de la vasopressine portant la mutation R137H. Il a été démontré que les récepteurs V2 portant la mutation R137H sont constitutivement désensibilisés dus à leur phosphorylation et interaction avec la β -arrestine (Barak et al., 2001). Cette désensibilisation constitutive pourrait expliquer la perte de la fonction rénale chez les patients, pourtant, un traitement avec le SR49059 chez 3 patients portant la mutation R137H a permis de récupérer leur fonction rénale. Nous avons donc posé l'hypothèse que dans le cas de la mutation R137H, le SR49059 pourrait stabiliser le récepteur mutant à la membrane et diminuer sa désensibilisation.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons étudié le recrutement de la β -arrestine et l'internalisation de ces récepteurs mutants suite au traitement avec le SR49059. Par des expériences de microscopie d'immunofluorescence et de BRET, nous avons démontré que le SR49059 ne réduisait pas du tout l'internalisation ni l'interaction constitutive entre le récepteur mutant et la β -arrestine mais au contraire, il semblait augmenter la quantité de récepteur pouvant interagir avec la β -arrestine. Alors, nous avons posé la deuxième hypothèse que ces récepteurs mutants, en plus d'être constitutivement désensibilisés, seraient mal acheminés à la membrane. Par des expériences de marquage métabolique, nous avons démontré que ces récepteurs mutants sont majoritairement retenus dans le réticulum endoplasmique, et que le SR49059 permet d'augmenter leur maturation. De plus, un antagoniste peptidique, ne pouvant pénétrer la membrane, ne peut ni mimer ni bloquer l'effet du SR49059, suggérant que l'effet du SR49059 est bien intracellulaire et non pas une stabilisation à la membrane. Ces résultats suggèrent que le SR49059 agit comme chaperon

pharmacologique en permettant à une plus grande porportion de récepteurs mutants d'atteindre la surface cellulaire et d'être fonctionnels.

Functional Rescue of the Constitutively Internalized V2 Vasopressin Receptor Mutant R137H by the Pharmacological Chaperone Action of SR49059

VIRGINIE BERNIER, MONIQUE LAGACÉ, MICHÈLE LONERGAN, MARIE-FRANÇOISE ARTHUS, DANIEL G. BICHET, AND MICHEL BOUVIER

Département de Biochimie and Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome (V.B., M.La., M.B.), Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7; and Unité de Recherche Clinique and Département de Médecine (V.B., M.Lo., M.-F.A., D.G.B.), Centre de Recherche et Service de Néphrologie, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, Montréal, Québec, Canada H4J 1C5

In most cases, nephrogenic diabetes insipidus results from mutations in the V2 vasopressin receptor (V2R) gene that cause intracellular retention of improperly folded receptors. We previously reported that cell permeable V2R antagonists act as pharmacological chaperones that rescue folding, trafficking, and function of several V2R mutants. More recently, the vasopressin antagonist, SR49059, was found to be therapeutically active in nephrogenic diabetes insipidus patients. Three of the patients with positive responses harbored the mutation R137H, previously reported to lead to constitutive endocytosis. This raises the possibility that, instead of acting as a pharmacological chaperone by favoring proper maturation of the recep-

tors, SR49059 could mediate its action on R137H V2R by preventing its endocytosis. Here we report that the β -arrestin-mediated constitutive endocytosis of R137H V2R is not affected by SR49059, indicating that the functional rescue observed does not result from a stabilization of the receptor at the cell surface. Moreover, metabolic labeling revealed that R137H V2R is also poorly processed to the mature form. SR49059 treatment significantly improved its maturation and cell surface targeting, indicating that the functional rescue of R137H V2Rs results from the pharmacological chaperone action of the antagonist. (*Molecular Endocrinology* 18: 2074–2084, 2004)

NATURALLY OCCURRING MUTATIONS involved in inherited diseases often result from misfolding and/or improper targeting of the mutated proteins (1). One of these diseases, nephrogenic diabetes insipidus (NDI)¹ is a rare X-linked disease characterized by the inability of the patients to concentrate their urine in response to the antidiuretic hormone, arginine vasopressin (AVP) (2). In the epithelial cells of the collecting duct of normal subjects, the binding of AVP to the V2 vasopressin receptor (V2R) leads to the activation of adenylyl cyclase and culminates in the translocation of the aquaporin-2 water channels to the apical membrane, resulting in increase water permeability (2). Over 150 different mutations within the coding sequence of the V2R gene are known to cause NDI, and more than 70% of the mutations tested cause reten-

tion of the receptor in the endoplasmic reticulum (ER) due to improper folding (3).

We previously showed that sustained treatment with nonpeptidic vasopressin antagonists can rescue cell surface expression and biological function of many NDI V2R mutants (4). Several lines of evidence indicate that these antagonists, which permeate cell membranes, mediate their action by binding receptors in the ER, therefore stabilizing a conformation of the receptor that can escape the quality control system and permits plasma membrane targeting (4). Because the mutant receptor recognized as improperly folded by the ER quality control often harbor subtle mutations that should have only modest effects on receptor function, the rescue of plasma membrane trafficking results, in many cases, into functional recovery. Such pharmacological chaperone action has also been proposed for other G protein-coupled receptors (GPCRs) involved in conformational diseases. For instance, small nonpeptidic GnRH antagonists have been shown to functionally rescue GnRH receptor mutants responsible for hypogonadotropic hypogonadism (5). Also, maturation and cell surface expression of the most common form of mutated rhodopsin causing autosomal dominant retinitis pigmentosa (P23H) was observed upon treatment with a seven-membered ring variant of the agonist 11-*cis*-retinal (6). This phenomenon is not limited to mutant receptors because it has

Abbreviations: AT_{1A}R, Angiotensin 1A receptor; AVP, arginine vasopressin; BRET, bioluminescence resonance energy transfer; ER, endoplasmic reticulum; GFP, green fluorescent protein; GPCR, G protein-coupled receptor; HA, hemagglutinin; HEK293T, human embryonic kidney 293 cells; NDI, nephrogenic diabetes insipidus; PFA, paraformaldehyde; Pluc, *Renilla* luciferase; V2R, V2 vasopressin receptor; WT, wild-type; YFP, yellow fluorescent protein.

Molecular Endocrinology is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

recently been shown to promote folding of wild-type (WT) δ -opioid receptors, which has a naturally low maturation efficiency (7).

In the case of NDI, treatment with the vasopressin antagonist SR49059 was found to promote water reabsorption and to decrease urinary output in several patients (8) confirming the therapeutic potential of pharmacological chaperones for conformational diseases. Not surprisingly, some of the patients that responded positively to the pharmacological chaperone treatment harbored V2R mutations such as W164S V2R and del62–64 V2R that had previously been shown to be poorly matured and retained intracellularly (4, 9). However, a V2R mutation associated with three of the positively responding patients, R137H, had been shown to promote constitutive receptor endocytosis as a result of increased phosphorylation and β -arrestin recruitment (10). This mutation, which resides within the DRY motif (a triplet of amino acids sequence highly conserved among family A GPCR), leads to similar phenotype for the α_{1B} adrenergic receptor (11), angiotensin II type 1A receptor (AT_{1A}R) (11), and rhodopsin (12), indicating that it could be a general trait for GPCR.

The above observations raise the possibility that some of the therapeutic potential of antagonists such as SR49059 could result from the inhibition of constitutive endocytosis rather than from their pharmacological chaperone action in the ER. To test this hypothesis, we investigated the mechanism underlying the functional rescue of R137H V2R upon SR49059 treatment. We found that the antagonist did not prevent the constitutive β -arrestin-promoted receptor endocytosis, ruling out this mode of action. However, in addition to be constitutively endocytosed, R137H V2R was found to be poorly matured and processed, a phenotype that could be reversed by the treatment with SR49059. This indicates that, as for other NDI V2R mutations, the beneficial effects of the treatment with an antagonist in patients carrying the R137H V2R

genotype results from its pharmacological chaperone action.

RESULTS AND DISCUSSION

Interaction between R137H V2R and β -Arrestin

As indicated in the introduction, the loss of function of R137H V2R has previously been attributed to a constitutive β -arrestin-mediated endocytosis that prevents stable cell surface expression of the receptor (10). It could thus be proposed that the functional rescue of R137H V2R, observed upon sustained treatment with the vasopressin antagonist, SR49059 (8), results from the inhibition of the constitutive β -arrestin recruitment that would lead to a stabilization of the receptor at the cell surface. To directly test this hypothesis, we assessed the effect of a sustained treatment of SR49059 on the subcellular distribution of the receptor and β -arrestin.

First, the ability of SR49059 to rescue the function of R137H V2R was confirmed. For this purpose, cells transiently expressing the hemagglutinin (HA)-tagged-R137H V2R were treated or not with 10^{-5} M SR49059 for different periods of time. The cells were then washed extensively and AVP-stimulated cAMP accumulation assessed. As shown in Fig. 1, pretreatment with the antagonist for 13 and 16 h increased the AVP response by 1.8- and 1.9-fold, respectively, whereas shorter term treatments had no effect. Consequently, the subcellular distribution of the receptor and β -arrestin was assessed after a 16-h treatment with SR49059 in cells stably expressing either myc-tagged-WT or HA-tagged-R137H V2R and transiently expressing β -arrestin2-yellow fluorescent protein (YFP). After extensive washing, cell surface receptors were labeled with anti-myc or anti-HA antibodies before AVP exposure. After permeabilization, the subcellular localization of the receptor was visualized using a

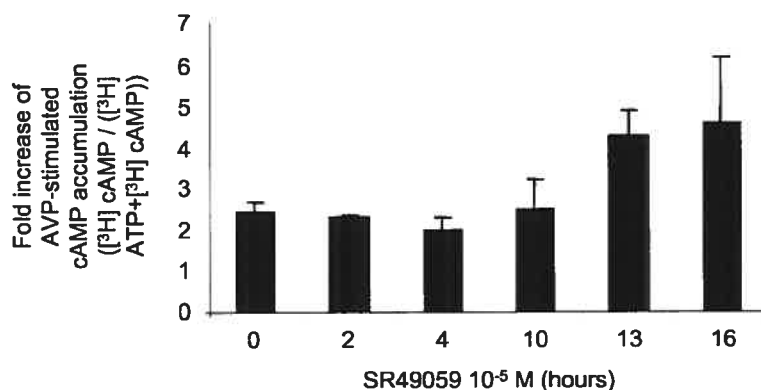


Fig. 1. Time-Dependent Functional Rescue of R137H V2R after SR49059 Pretreatment

Cos-1 cells transiently expressing HA-R137H V2R were incubated with 10^{-5} M SR49059 for up to 16 h and labeled with [3 H]adenine for 16 h. Cells were then washed extensively and incubated or not with 10^{-5} M AVP for 20 min. After cell lysis, [3 H]cAMP was purified using ion exchange chromatography. Data are expressed as fold increase over basal of cAMP accumulation ($[^3\text{H}]\text{cAMP}/([^3\text{H}]\text{ATP} + [^3\text{H}]\text{cAMP})$) and represent the mean \pm SEM of three independent experiments.

Texas red-coupled secondary antibody, whereas β -arrestin was detected by direct excitation of the YFP at 488 nm. In cells that were not pretreated with SR49059, both WT and R137H V2R behaved as previously reported (10). Under basal conditions, the WT V2R is predominantly present at the cell surface, whereas the β -arrestin2 is diffusely distributed throughout the cytosol. Upon stimulation with AVP, the receptor is internalized and colocalized with β -arrestin2 in endocytic vesicles. In the case of R137H V2R, an important proportion of the receptors are constitutively endocytosed and are found to colocalize with β -arrestin2 even in the absence of AVP stimulation. As shown in Fig. 2, pretreatment of cells with SR49059 did not affect the subcellular distribution of either WT or R137H V2R, indicating that the pretreatment with the antagonist did not affect the propensity of R137H V2R to constitutively interact with β -arrestin and to be rapidly internalized once it reaches the cell surface.

To further assess the potential influence of SR49059 on the constitutive interaction between R137H V2R and β -arrestin, we took advantage of the bioluminescence resonance energy transfer (BRET) technique recently developed in our laboratory (13, 14). This technique probes the proximity between two proteins by measuring the transfer of energy between a luminescent donor [*Renilla* luciferase (*Rluc*)] and a fluorescent acceptor [green fluorescent protein (GFP)]. Indeed, transfer of energy occurs only if the donor and

acceptor are separated by less than 100 Å. Thus, the recruitment of β -arrestin to the receptor can be monitored by determining the transfer of energy between V2R-*Rluc* and β -arrestin2-GFP10 fusion proteins.

The two hybrid proteins were transiently cotransfected in cells and the energy transfer between the two partners determined after the addition of coelenterazine DeepBlueC, the substrate for *Rluc*. The BRET signal was measured as a ratio of the fluorescence emitted by the GFP10 (determined in the 500- to 530-nm window) over the light emitted by the *Rluc* (determined in the 370- to 450-nm window). As shown in Fig. 3, no significant BRET was observed between WT-*Rluc* V2R and β -arrestin2-GFP10, whereas AVP stimulation led to a significant transfer of energy between the two proteins, reflecting the agonist-promoted translocation of β -arrestin2 to the receptor. For R137H V2R, a significant BRET was observed between the receptor-*Rluc* fusion and the β -arrestin even in the absence of AVP stimulation, confirming the ability of the mutant receptor to constitutively interact with β -arrestin. This spontaneous recruitment of β -arrestin to R137H V2R was not inhibited by the pretreatment with SR49059, indicating that the restoration of signaling activity promoted by this treatment (Ref. 8 and Fig. 1) cannot be attributed to an inhibition of the β -arrestin-mediated desensitization. In fact, both the basal and AVP-stimulated BRET were increased by the preincubation with the antagonist. A similar albeit more modest increase in the AVP-stim-

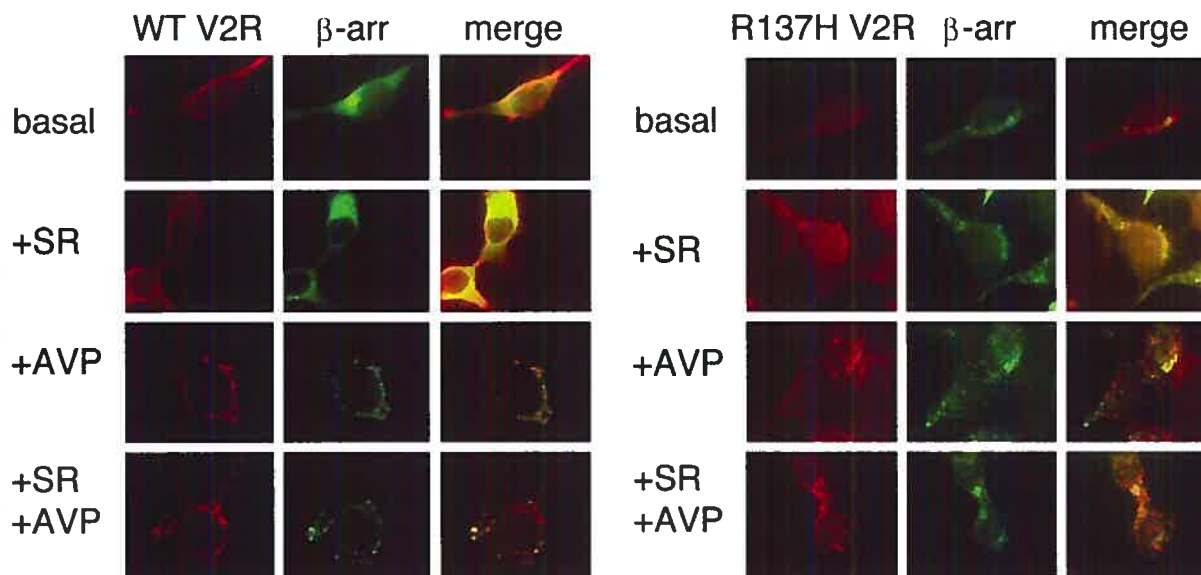


Fig. 2. Subcellular Distribution of V2R and β -Arrestin2

HEK293T cells stably expressing myc-WT or HA-R137H V2R were transiently transfected with β -arrestin2-YFP and incubated in the absence or presence of 10^{-5} M SR49059 (SR) for 16 h. Cells were then washed extensively and the receptors labeled with the appropriate antibodies (anti-myc for WT and anti-HA for R137H) under nonpermeabilized condition before a 10-min incubation with AVP. Cells were then fixed, permeabilized, and incubated with a Texas red-conjugated secondary antibody to visualize the receptors (red). Direct fluorescence of β -arrestin2-YFP was detected at 520 nm upon excitation at 488 nm (green). V2R and β -arrestin2 images were acquired separately by fluorescence microscopy using a $\times 60$ oil immersion objective. Colocalization between V2R and β -arrestin was assessed by merging the two images (yellow). The images shown are representative of many fields observed in two independent experiments.

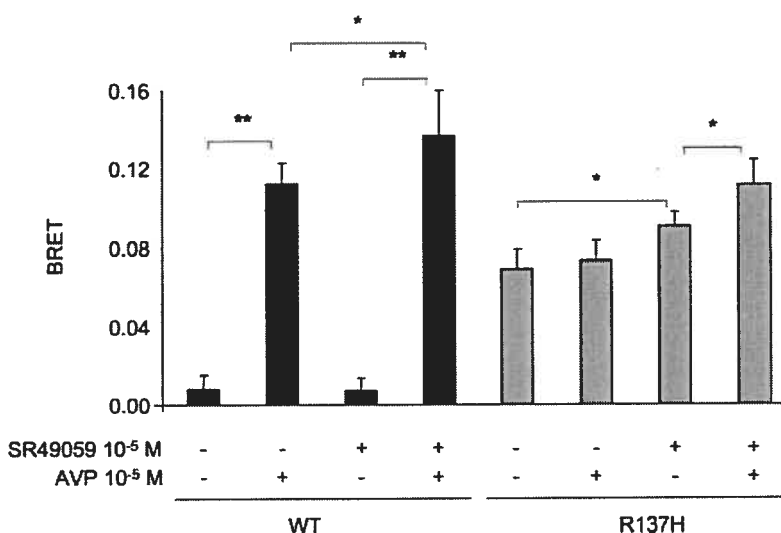


Fig. 3. Interaction between V2R and β -Arrestin2 in Living Cells after SR49059 Pretreatment

HEK293T cells were transiently cotransfected with WT-Rluc or R137H-Rluc V2R along with β -arrestin2-GFP10 and incubated in the absence or presence of SR49059 10⁻⁵ M for 16 h. Cells were then washed extensively, transferred to 96-well plates and incubated or not with AVP for 10 min. The energy transfer was initiated by the addition of DeepBlueC 5 μ M to each well and BRET measured in a modified TopCount NXT apparatus (Packard). Data were obtained from eight independent experiments (*, $P < 0.01$; **, $P < 0.00005$).

ulated recruitment of β -arrestin was also observed for the WT receptor after agonist pretreatment. The most likely explanation for this increase is that the treatment with SR49059 increases the proportion of receptor-Rluc that can be processed to the cell surface where they can interact with β -arrestin and generate a BRET signal. Interestingly, AVP did not increase the BRET between R137H-Rluc V2R and β -arrestin2-GFP10 in control cells, consistent with the notion that this mutant receptor is rapidly endocytosed and is not accessible for activation by AVP. After antagonist pretreatment, AVP promoted a small but significant increase in the BRET between R137H-Rluc V2R and β -arrestin2-GFP10, indicating that the pretreatment led to a greater proportion of the receptor at the cell surface (see next section).

In the original studies characterizing the constitutive endocytic properties of R137H V2R, Barak et al. (10) reported that the spontaneous recruitment of β -arrestin results from a constitutive phosphorylation of the receptor. Because agonist activation of WT receptors also leads to a phosphorylation-dependent recruitment of β -arrestin, one could propose that the R137H mutation mimics the agonist occupied/phosphorylated form of the WT receptor, thus having a high affinity for β -arrestin. To test this hypothesis, we took advantage of the BRET assay to assess the relative affinity of β -arrestin for the WT and R137H V2R in the presence and absence of AVP stimulation. For this purpose, BRET titration curves (15) that allow determination of apparent affinities between BRET partners were generated. These curves were obtained by transfecting increasing amount of β -arrestin2-GFP10 while maintaining the quantity of receptor-Rluc constant.

Because of the small changes in the receptor-Rluc expression that can occur upon cotransfection with increasing amount of β -arrestin2-GFP10, the BRET values are expressed as a function of the total β -arrestin2-GFP10 fluorescence/total receptor-Rluc luminescence. As shown in Fig. 4, no significant BRET was observed between the WT-Rluc V2R and β -arrestin2-GFP10 in the absence of AVP even at the highest concentration of the latter. Addition of AVP increased the BRET value as a hyperbolic function of the β -arrestin2-GFP/receptor-Rluc ratio. Fifty percent of the maximal BRET (BRET₅₀) was reached at a GFP/Rluc ratio of 0.02. For the R137H-Rluc V2R construct, increasing β -arrestin2-GFP10 concentrations led to a hyperbolic increase of BRET both in the absence and presence of AVP with BRET₅₀ values of 0.09 and 0.08, respectively. These very similar BRET₅₀s are consistent once more with the notion that the constitutively endocytosed mutant receptor constitutively recruit β -arrestin and is not accessible to agonist stimulation. Interestingly, the apparent affinity of β -arrestin2 for R137H V2R appears to be lower than for the agonist-occupied WT receptor (BRET₅₀ of 0.09 vs. 0.02 for the WT receptor). Although this apparent change in affinity could be attributable to a direct effect of the mutation on the receptor- β -arrestin interaction, it could also suggest that the overall conformation of R137H V2R does not fully mimic that of the ligand-activated receptor. Both agonist occupancy and receptor phosphorylation have been proposed to contribute to the increased affinity of β -arrestin for the activated receptors (16, 17). The conformational landmarks of the activated form of the receptor (R*) and the phosphorylation sites are believed to be recognized by distinct

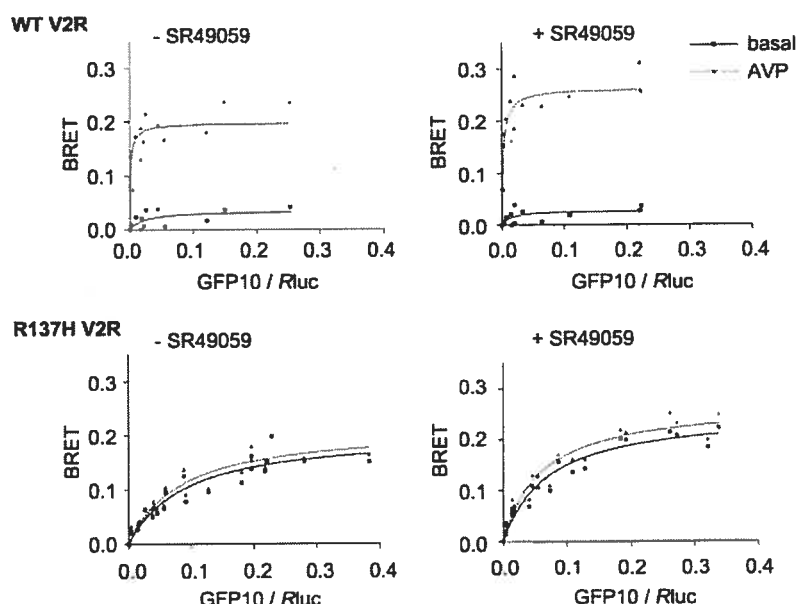


Fig. 4. Affinity of Interaction between V2R and β -Arrestin2 in Living Cells after SR49059 Pretreatment

HEK293T cells were transiently cotransfected with WT-Rluc or R137H-Rluc V2R along with increasing amount of β -arrestin2-GFP10, and incubated in the absence or presence of SR49059 10^{-5} M for 16 h. After extensive washing, cells were stimulated with AVP and BRET measured as described in Fig. 3. The BRET values were plotted against the ratio of GFP/Rluc and the BRET₅₀ deduced from the titration curve as the GFP/Rluc value that gives 50% of the maximum BRET. Data were obtained from four independent experiments and analyzed by nonlinear regression using Prism 3.0 (GraphPad, San Diego, CA).

domains of β -arrestin. Following this model, the low-affinity binding of β -arrestin to R137H V2R could be explained by the presence of the phosphorylation sites in the absence of some of the other landmarks of R*. This obviously raises a question regarding the cause of the desensitized state of R137H V2R. Does the R137H mutation directly lead to a desensitized state, or is the desensitization secondary to a constitutive activation of the receptor? The present data do not allow to unambiguously distinguish between these two possibilities. However, consistent with a desensitization that could be independent of a constitutive activation, mutant forms of R137H V2R, lacking the phosphorylation sites needed for the constitutive β -arrestin recruitment and desensitization, did not show any detectable increase in basal cAMP production (10).

As can be seen in Fig. 4, pretreatment with SR49059 slightly increased both the agonist-promoted and constitutive BRET between the receptor-Rluc and β -arrestin2-GFP10 for the WT and R137H V2R, respectively, without affecting the BRET₅₀. As already discussed above, this increase in BRET most likely reflects the increased proportion of receptor-Rluc that can be correctly processed and trafficked to the plasma membrane where it can productively interact with β -arrestin (see next section). Taken together, these results indicate that a sustained pretreatment with SR49059 does not inhibit the interaction between R137H V2R and β -arrestin and therefore suggests that the functional rescue observed upon such pretreat-

ment cannot be attributed to a relief of the constitutive desensitization.

In the previous experiment, SR49059 was removed from the medium before monitoring the interaction between the receptor and β -arrestin, an experimental paradigm that mimics the conditions used to assess the functional rescue promoted by SR49059 treatment. One could therefore argue that the continued presence of the antagonist would be required to detect an inhibitory effect on the interaction between R137H V2R and β -arrestin. To test this hypothesis, the BRET between R137H-Rluc V2R and β -arrestin2-GFP10 was assessed in the presence and absence of SR49059 for 0–60 min. As shown in Fig. 5, direct treatment with SR49059 did not inhibit the constitutive interaction between the mutant receptor and β -arrestin. This contrasts with the ability of the SR49059 treatment to inhibit the AVP-promoted β -arrestin recruitment observed with the WT receptor by competing for the ligand binding site and preventing receptor activation (Fig. 5, *inset*). These data confirm that binding of SR49059 to the mutant receptor does not inhibit its ability to spontaneously recruit β -arrestin.

Pharmacological Chaperone Action of SR49059

Because the ability of SR49059 treatments to restore R137H V2R signaling activity cannot be attributed to an inhibition of the spontaneous β -arrestin recruitment, we hypothesized that it could result from a pharmacological chaperone action of the antagonist

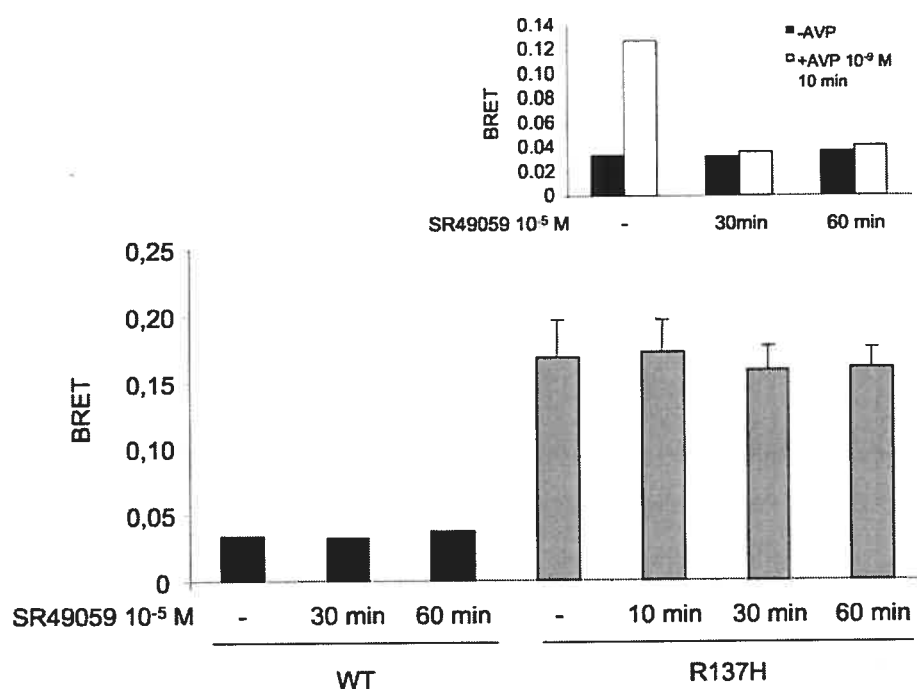


Fig. 5. Interaction between V2R and β -Arrestin2 in Living Cells after Short Stimulation with SR49059

HEK293T cells were transiently cotransfected with WT-Rluc V2R or R137H-Rluc V2R along with β -arrestin2-GFP10. Cells were transferred to 96-well plates and incubated or not with SR49059 10^{-5} M for 0–60 min. Data represent the mean \pm SEM of four independent experiments. *Inset*, HEK293T cells transiently cotransfected with WT-Rluc V2R and β -arrestin2-GFP10 were incubated or not with AVP for 10 min in the absence or the continued presence of SR49059. BRET was measured as described in Fig. 3.

by increasing the proportion of mutant receptor that reaches the plasma membrane. This could lead to an increased signaling activity because the constitutively desensitized receptor is not completely inactive and shows residual signaling efficacy (10). To directly test the possible pharmacological chaperone action of SR49059 on R137H V2R, the ability of the compound to rescue vasopressin-stimulated adenylyl cyclase activity was assessed in the presence and absence of monensin, an agent known to block the transport from the Golgi to the plasma membrane by affecting the activity of the glycosyltransferases in the Golgi network (18). If, as proposed, the SR49059 functions as a pharmacological chaperone by promoting the trafficking of neosynthesized receptor to the plasma membrane, treatment with monensin should inhibit its action. As shown in Fig. 6A, under control conditions, pretreatment of cells expressing R137H V2R with SR49059 for 16 h significantly increased the ability of AVP to stimulate cAMP production, confirming that the antagonist can promote the partial functional recovery of R137H (8). Cotreatment of the cells with monensin completely blocked the effect of SR49059 on the AVP-stimulated cAMP, indicating that the transport of new receptors to the plasma membrane is required. This is consistent with a pharmacological chaperone action of SR49059 that would bind to the mutant receptor inside the cell, stabilize it, and facilitate its processing through the quality control system

of the ER (4, 7). The fact that the potentiating effect of SR49059 could not be observed for treatment times shorter than 13 h (Fig. 1) is in agreement with a mechanism requiring receptor maturation and transport (19). Also consistent with an intracellular site of action of SR49059 is the observation that pretreatment with the membrane impermeable peptidic antagonist H3192 was unable to potentiate the AVP-stimulated cAMP accumulation (Fig. 6A).

The pharmacological chaperone mode of action of SR49059 is further supported by the fact that the potentiated AVP-stimulated cAMP production promoted by the nonpeptidic antagonist treatment was accompanied by a noticeable increase in the amount of R137H V2R detected at the cell surface by immunofluorescence (Fig. 6B). Quantitative assessment, using ELISA, revealed that the 16-h treatment with SR49059 led to a 1.8 ± 0.3 -fold increase in the amount of cell surface R137H V2R (Fig. 6C). Although this may not seem like a dramatic increase, the ELISA signal observed after the treatment reached approximately 20% of that observed when equivalent amount of WT receptor DNA was transfected in parallel experiments (data not shown). Such increase in R137H V2R expression level may thus be sufficient to explain the relatively modest increase in AVP-stimulated cAMP production observed after the SR49059 treatment. Antagonist treatments were also found to increase the cell surface expression of two other GPCRs harboring

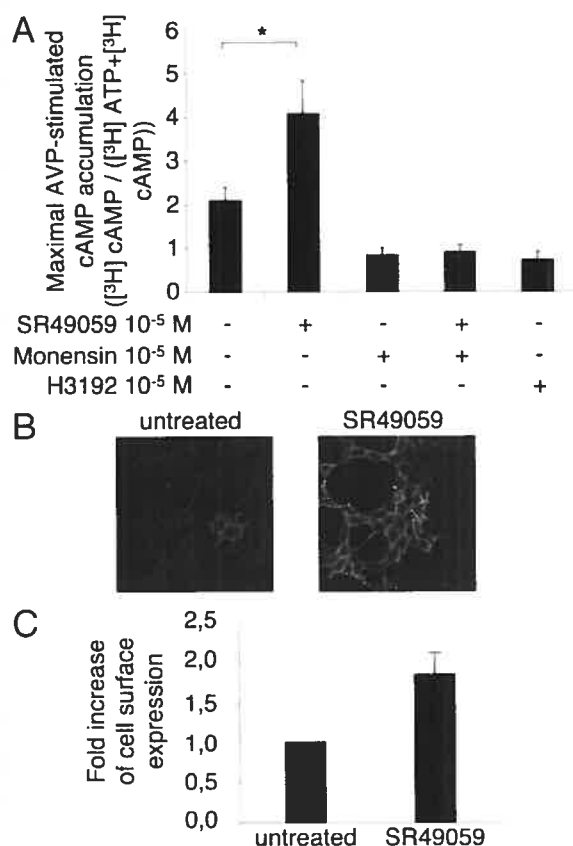


Fig. 6. Intracellular Site of Action for SR49059

A, AVP-stimulated cAMP accumulation was measured in Cos-1 cells transiently expressing the HA-R137H V2R. Cells were labeled with [3 H]adenine and treated or not with 10^{-5} M of SR49059, 10^{-5} M H3192, and 10^{-5} M monensin for 16 h as indicated. Cells were then washed extensively and incubated or not with 10^{-5} M AVP for 20 min. After cell lysis, [3 H]cAMP was purified by ion exchange chromatography. Data are expressed as [3 H]cAMP/([3 H]ATP + [3 H]cAMP) and represent the mean \pm SEM of four independent experiments (*, $P < 0.01$). **B**, HEK293T cells stably expressing HA-R137H V2R were incubated in the presence or absence of 10^{-5} M SR49059 for 16 h. Surface receptors were detected with mouse anti-HA antibody under nonpermeabilized condition, the immunoreactivity revealed with an Oregon-green-conjugated secondary antibody and visualized by confocal fluorescence microscopy using a $\times 100$ Apo Plan objective. The images shown are representative of many fields observed in five independent experiments. **C**, HEK293T cells transiently expressing HA-R137H V2R were incubated in the presence or absence of 10^{-5} M SR49059 for 16 h. Surface receptors were detected using mouse anti-HA antibody under nonpermeabilized condition followed by horseradish peroxidase conjugated antimouse antibody. The substrate *o*-phenylenediamine dihydrochloride was added for 7 min, the reaction was stopped with 200 μ l of 3 N HCl, and the extinction was measured at 492 nm.

equivalent mutation in the DRY motif. Indeed, overnight treatments with the α 1-adrenergic and angiotensin II antagonist, phentolamine and L158 809, favored cell surface localization of the R143E α 1B adrenergic receptor and the R126H AT $_1$ R, respectively (11). Be-

cause, as is the case for the R137H V2R, these mutants were found to be constitutively internalized and associated with β -arrestin, the authors suggested that this could result from an inhibition of the internalization. However, they noted that they could not rule out a pharmacological chaperone effect leading to an increase cell surface targeting. In the present study, the observation that the treatment with the antagonist did not affect the constitutive interaction between the receptor and β -arrestin strongly suggest that the increase cell surface expression is due to the pharmacological chaperone action of SR49059.

To further probe this mechanism of action, metabolic labeling experiments were carried out. Cells expressing either WT or R137H V2R were treated or not with SR49059 before being labeled for 30 min in a methionine/cysteine-free medium containing [35 S]methionine/cysteine. A chase of up to 2 h was then initiated in the continued presence or absence of SR49059. Receptors were then solubilized, immunoprecipitated and separated on a SDS-PAGE gel. As shown in Fig. 7 and as previously reported (4), the WT V2R is synthesized as a 38-kDa precursor form and processed to a mature 48-kDa species over time such that most of the receptor is in its mature form after the 2-h chase. In contrast, very little of the R137H V2R was processed to the mature form even at the end of the 2-h chase, suggesting that this mutant receptor was poorly processed and that a sizable proportion was degraded. This altered maturation profile is characteristic of receptor mutants that are retained in the ER by the quality control system. Although the SR49059 treatment had no apparent effect on the extent of maturation for the WT receptor, it reproducibly increased by 40% the amount of R137H V2R reaching the mature form at the end of the 2-h chase. This effect of the antagonist is reminiscent of the effect previously observed for other ER-retained V2R mutants treated with a different antagonist having pharmacological chaperone properties (4). Therefore, these results strongly support the notion that SR49059 act as a pharmacological chaperone on R137H V2R.

In their original description of the R137H V2R, Barak *et al.* (10) showed that its coupling properties could be improved by mutations that prevent the constitutive phosphorylation and endocytosis of the receptor. If as proposed above, the action of SR49059 on R137H V2R is independent of this constitutive internalization and results from its pharmacological chaperone activity, one would predict that the SR49059 treatment would also increase the signaling efficacy of receptors lacking the constitutive phosphorylation sites. As shown in Fig. 8A, this is indeed the case. SR49059 treatment potentiated the AVP-stimulated adenylyl cyclase in cells expressing a mutant form of R137H V2R truncated from its last nine amino acids that encompass the phosphorylation sites (R137H-T362 V2R). In fact, the potentiating effect was even greater than that

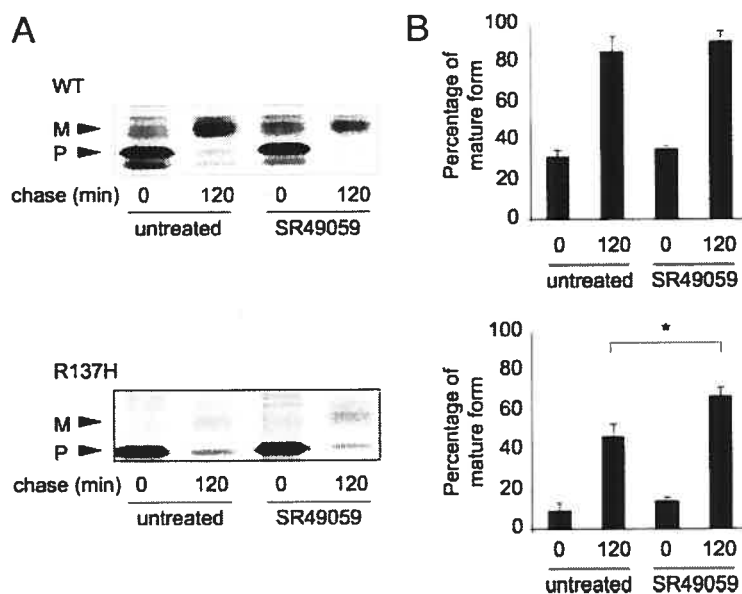


Fig. 7. Effect of SR49059 Treatment on V2R Maturation

HEK293T cells expressing *myc*-WT or HA-R137H V2R were incubated in the absence or presence of 10^{-5} M SR49059 for 16 h. Labeling was carried out with 450 μ Ci/dishes [35 S] methionine/cysteine for 30 min followed by a chase in the continued presence of SR49059 for the indicated times. A, Immunopurified receptor species were resolved by SDS-PAGE and revealed by autoradiography. The precursor (P) and mature (M) species are indicated. The panels shown are representative of three independent experiments (*, $P < 0.005$). B, The intensity of the bands were determined by densitometry and the proportion of the mature/(mature + precursor) species determined. The data shown represent the mean \pm SEM of three independent experiments.

observed for the full-length R137H V2R. This is not surprising because the positive effect on receptor maturation observed for the R137H-T362 V2R (Fig. 8B) can no longer be blunted by the rapid constitutive endocytosis of the rescued receptor.

Taken together, our results suggest that SR49059 rescue cell surface expression and signaling efficacy of R137H V2R by acting intracellularly as a pharmacological chaperone and not by inhibiting its constitutive endocytosis. This is different from the recently described action of an AT₁ angiotensin inverse agonist on the cell surface expression of a constitutively active and internalized mutant receptor. Indeed, Miserey-Lenkei *et al.* (20) reported that treatment of cells expressing a constitutively active mutant form of the AT_{1A}R (L305Q AT_{1A}R) with losartan prevented the endocytosis of the receptor and promoted its externalization from endocytotic pools to the plasma membrane.

In conclusion, our results suggest that the beneficial clinical effect that SR49059 treatment had in three NDI patients resulted from its pharmacological chaperone action on a portion of the receptor population that could not reach an ER export competent conformation. Although not achieved by the SR49059 treatment, inhibition of the constitutive interaction of R137H V2R with β -arrestin, and the resulting endocytosis, represents another avenue to further increase its signaling efficacy. There is no doubt that a compound that could both inhibit the constitutive endocytosis and act as pharmacologi-

cal chaperone would be a better drug candidate to treat NDI patients harboring the R137H V2R mutation. However, whether such a compound can exist remains to be investigated.

MATERIALS AND METHODS

Materials

DMEM, fetal bovine serum, penicillin, streptomycin, glutamine, fungizone, gentamicin (G418), and PBS were all from Wisent Inc. (St-Bruno, Quebec, Canada) Cell culture plates and dishes were from Corning (Corning, NY). BSA, the substrate *o*-phenylenediamine dihydrochloride, AVP, and 3-isobutyl-1-methyl-xanthine were from Sigma (St. Louis, MO). Monensin was from Calbiochem (La Jolla, CA). H3192 was from Bachem (Torrance, CA). SR49059 was a generous gift from Sanofi-Synthelabo Research (Toulouse, France). Bradford reagent was from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). [3 H] adenine, [35 S]cysteine/methionine and En³Hance autoradiography enhancer were from NEN Life Science Products (Boston, MA). Oregon-green-conjugated antimouse antibodies and Texas-red conjugated antimouse antibodies were from Molecular Probes (Eugene, OR). Horseradish peroxidase conjugated antimouse antibody were from Amersham Pharmacia Biotech (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Mouse anti-*myc* antibodies (9E10 clone) and mouse anti-HA antibodies (12CA5) were produced by our core facility as ascite fluids. Biomax films were from Eastman Kodak Co. Scientific Imaging Systems (Rochester, NY). The DeepBlueC coelenterazine and white Optiplate were from PerkinElmer (Boston, MA).

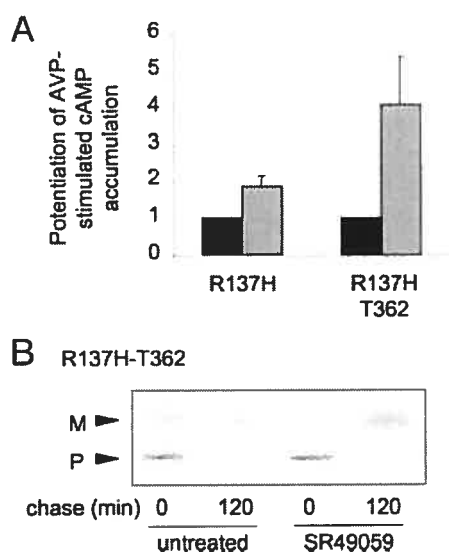


Fig. 8. Functional and Maturation Rescue of R137H-T362 V2R by SR49059

A. AVP-stimulated cAMP accumulation was measured in Cos-1 cells transiently expressing HA-R137H V2R or HA-R137H-T362 V2R. Cells were labeled with [3 H]adenine and treated or not with 10^{-5} M of SR49059 for 16 h. Cells were then washed extensively and incubated or not with 10^{-5} M AVP for 20 min. After cell lysis, [3 H]cAMP was purified by ion exchange chromatography. Data are expressed as [3 H]cAMP/([3 H]ATP + [3 H]cAMP) and represent the mean \pm SEM of three independent experiments. **B.** HEK293T cells expressing HA-R137H V2R or HA-R137H-T362 V2R were incubated in the absence or presence of 10^{-5} M SR49059 for 16 h. Labeling was carried out with 450 μ Ci/dishes [35 S] methionine/cysteine for 30 min followed by a chase in the continued presence of SR49059 for the indicated times. Receptor species were resolved by SDS-PAGE and revealed by autoradiography. The precursor (P) and mature (M) species are indicated.

DNA Construct

For BRET experiments, the WT-Rluc V2R fusion construct was generated by subcloning the Rluc coding sequence 3' of the V2R coding sequence within the pcDNA3.1-V2R so that a six-amino acid linker (GSGTGS) separated the carboxyl terminal of V2R and the initiator methionine of Rluc. R137H-Rluc V2R was constructed using PCR-based, site-directed mutagenesis to introduce the mutation R137H in the pcDNA3.1-WT-Rluc V2R. For the β -arrestin-GFP10, the rat β -arrestin2 coding sequence was subcloned in frame 5' of the GFP variant GFP10 (15) coding sequence within the pcDNA3.1-V2R-GFP (13), after removing the V2R coding sequence. This led to a construct in which the carboxyl terminal of the β -arrestin was separated from the initiator methionine of GFP10 by a six-amino acid linker (GSGTGS). All DNA constructs were confirmed by direct sequencing. The HA-tagged R137H V2R and R137H-T362 V2R constructs were provided from the laboratory of Dr. Marc Caron (10) and the myc-tagged WT V2R (4) and β -arrestin-YFP (21) were already available in the lab.

Cell Culture and Transfections

Human embryonic kidney 293 cells (HEK293T) and Cos-1 cells were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal

bovine serum, 100 U/ml penicillin/streptomycin, and 2 mM L-glutamine. Mammalian expression plasmids encoding the cDNA for the V2R harboring either myc (WT) or HA tags (R137H and R137H-T362) at their N terminal were transiently transfected in HEK293T cells using Fugene (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's recommendation or in Cos-1 cells using the diethylaminoethyl-Dextran method (22). The WT-Rluc V2R, R137H-Rluc V2R, and β -arrestin2-GFP10 constructs described above were transiently transfected in HEK293T cells using the calcium phosphate precipitation procedure (23). For the transient transfections, cells were allowed to express the foreign DNA for 48 h before performing the experiments. Stable HEK293T cell lines expressing either myc-WT or HA-R137H V2R were generated by standard selection procedure using the Geneticin selection marker and by growing cells in DMEM containing 450 μ g/ml Geneticin. Receptor expression was assessed by immunofluorescence microscopy using anti-HA or anti-myc antibodies (as described in *Fluorescence Microscopy*) and clonal cell lines were derived. These cells were transiently transfected with β -arrestin2-YFP using the calcium phosphate precipitation method.

cAMP Accumulation

Cos-1 cells transiently expressing myc-WT or HA-R137H V2R were metabolically labeled with [3 H]adenine (2 μ Ci/well) in six-well plates for 16 h at 37 C. They were then washed twice with PBS, stimulated with 10 μ M AVP for 20 min at 37 C and the reaction stopped at 4 C with 5% trichloroacetic acid. The transformation of [3 H]ATP into [3 H]cAMP was assessed by separating the nucleotides using ion exchange chromatography as previously described (24).

Fluorescence Microscopy

Cell surface immunofluorescence studies were carried out as previously described (4). HEK293T cells stably expressing the WT or R137H V2R were washed and incubated with antibodies (1:50) directed against myc- or HA-epitope tags present at the N terminus of receptors for 1 h at 4 C. The cells were then washed, fixed with 3% paraformaldehyde (PFA) in PBS for 15 min at 4 C, and permeabilized with PBS/0.5% BSA/0.2% Triton X-100 for 10 min at room temperature. Immunoreactivity of the receptor was then revealed using secondary Oregon-green-conjugated antimouse antibodies (1:500), the coverslips were mounted on glass microscope slides, and the images were acquired on a Leica HM IRBE laser-scanning microscope with a $\times 100$ objective (Leica Microsystems, Mannheim, Germany).

To determine the subcellular distribution of β -arrestin and V2R simultaneously, fluorescence microscopy was used. HEK293T cells stably expressing the WT or R137H V2R and transiently expressing the β -arrestin-YFP were washed and incubated with antibodies (1:50) directed against myc- or HA-epitope tag present at the N terminus of receptors for 1 h at 4 C. The cells were then stimulated with 10 μ M AVP for 10 min at 37 C, washed, fixed with 3% PFA in PBS for 15 min at 4 C, and permeabilized with PBS/0.5% BSA/0.2% Triton X-100 for 10 min at room temperature. Immunoreactivity of the receptor was then revealed using secondary Texas red-conjugated antimouse antibodies (1:500) (Molecular Probes) (red). Direct fluorescence of the β -arrestin2-YFP was detected at 520 nm upon excitation at 488 nm (green). V2R and β -arrestin2-YFP images were acquired separately with a Nikon-eclipse TE2000-U (Nikon, Kanagawa, Japan) and colocalization (yellow) monitored by merging the images using the software Metamorph (Universal Imaging Corp., Downingtown, PA).

BRET

HEK293T cells transiently expressing WT-*Rluc* or R137H-*Rluc* V2R along with β -arrestin2-GFP10 were washed with PBS/0.1% glucose, detached with PBS/5 mM EDTA and resuspended with PBS/0.1% glucose. Cells were then distributed in 96-well microplates (white Optiplat) at a density of approximately 100,000 cells/well. DeepBlueC coelenterazine was added at a final concentration of 5 μ M, and readings were collected using a modified TopCount NXT apparatus (Packard Bioscience, PerkinElmer) that allows the sequential integration of the signals detected in the 370- to 450-nm and 500- to 530-nm windows using filters (Chroma, Rockingham, VT) with the appropriate band pass. The BRET signal was determined by calculating the ratio of the fluorescence emitted by the β -arrestin-GFP10 (500–530 nm) over the light emitted by the receptor-*Rluc* (370–450 nm). The values were corrected by subtracting the background signal detected when the receptor-*Rluc* was transfected alone. For BRET titration curve experiments, cells were transfected with a constant amount of receptor-*Rluc* construct and increasing quantities of β -arrestin2-GFP. Total luminescence (receptor-*Rluc*) and fluorescence (β -arrestin2-GFP) was measured in each sample using a lumicount and fluorocount (PerkinElmer Life Sciences). The BRET signal obtained was plotted against the ratio of *Rluc* luminescence/GFP fluorescence.

ELISA

HEK293T cells transiently expressing HA-R137H V2R were washed and incubated with antibodies (1:500) directed against HA-epitope for 1 h at 4 C. Cells were then washed, fixed with 3% PFA in PBS for 15 min at 4 C, and incubated with horseradish peroxidase conjugated antimouse antibody (1:1000) for 30 min. The substrate *o*-phenylenediamine dihydrochloride was added according to the manufacturer's instructions for 7 min. The reaction was stopped with 200 μ l of 3 N HCl, and extinction was measured at 492 nm.

Metabolic Labeling and Immunoprecipitation

HEK293T cells transiently expressing *myc*-WT or HA-R137H V2R were starved for 30 min in methionine/cysteine-free DMEM, labeled for 30 min with 450 μ Ci/100-mm Petri dishes of [³⁵S]-cysteine/methionine. Cells were then lysed by sonication and membranes centrifuged at 36,000 \times *g* for 20 min. The crude membrane preparation was solubilized in 0.5% *n*-dodecyl- β -D-maltoside (Roche Diagnostics) for 1 h and centrifuged 1 h at 145,000 \times *g* to get rid of insoluble material. Solubilized receptors were immunoprecipitated with anti-*myc* or anti-HA antibodies and G protein Sepharose. Immunopurified receptors were subsequently resolved on 10% SDS-PAGE and the gel treated with En³Hance autoradiography enhancer before being exposed to Biomax film at –80 C.

Statistical Analysis

Statistical significance of the difference was determined using Student's *t* test analysis.

Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Claudine Serradeil-Le Gal (Sanofi-Synthelabo Research) for the generous gift of the SR49059, and Drs. Marc Caron and Larry Barak (both from Duke University, Durham, NC) for providing the R137H V2R and R137H-T362 V2R constructs. We also thank Drs. Ali Salahpour (Duke University) and Jean-Pierre Morello (Astra Zeneca) for insightful discussions as well as Louise Courmoyer and André Laperrière (both from Université de Montréal) for technical assistance.

Received February 25, 2004. Accepted May 19, 2004.

Address all correspondence and requests for reprints to: Michel Bouvier, Department of Biochemistry, Université de Montréal, C.P. 6128 Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7.

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (D.G.B.) and from the Kidney Foundation of Canada (M.B. and D.G.B.). V.B. is supported by a doctoral studentship from the Heart and Stroke Foundation of Canada and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. M.B. holds a Canadian Research Chair in Signal Transduction and Molecular Pharmacology. D.G.B. holds a Canadian Research Chair in Genetics in Renal Diseases.

REFERENCES

- Kopito RR, Ron D 2000 Conformational disease. *Nat Cell Biol* 2:E207–E209
- Bichet DG, Fujiwara TM 2001 Nephrogenic diabetes insipidus. 4181–4204
- Morello JP, Bichet DG 2001 Nephrogenic diabetes insipidus. *Annu Rev Physiol* 63:607–630
- Morello JP, Salahpour A, Laperrière A, Bernier V, Arthus MF, Loneragan M, Petaja-Repo U, Angers S, Morin D, Bichet DG, Bouvier M 2000 Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants. *J Clin Invest* 105: 887–895
- Janovick JA, Maya-Nunez G, Conn PM 2002 Rescue of hypogonadotropic hypogonadism-causing and manufactured GnRH receptor mutants by a specific protein-folding template: misrouted proteins as a novel disease etiology and therapeutic target. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3255–3262
- Noorwez SM, Kuksa V, Imanishi Y, Zhu L, Filipek S, Palczewski K, Kaushal S 2003 Pharmacological chaperone-mediated in vivo folding and stabilization of the P23H-opsin mutant associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *J Biol Chem* 278: 14442–14450
- Petaja-Repo UE, Hogue M, Bhalla S, Laperrière A, Morello JP, Bouvier M 2002 Ligands act as pharmacological chaperones and increase the efficiency of δ opioid receptor maturation. *EMBO J* 21:1628–1637
- Bichet DG, Bouvier M, Brouard R, Morello J-P, Bernier V, Loneragan M, Arthus MF 2002 Decrease in urine volume and increase in urine osmolality after SR49059 administration in five adult male patients with X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol* (Abstract SA-FC193)
- Oksche A, Schulein R, Rutz C, Liebenhoff U, Dickson J, Muller H, Birnbaumer M, Rosenthal W 1996 Vasopressin V2 receptor mutants that cause X-linked nephrogenic diabetes insipidus: analysis of expression, processing, and function. *Mol Pharmacol* 50:820–828
- Barak LS, Oakley RH, Laporte SA, Caron MG 2001 Constitutive arrestin-mediated desensitization of a human vasopressin receptor mutant associated with nephrogenic diabetes insipidus. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 93–98
- Wilbanks AM, Laporte SA, Bohn LM, Barak LS, Caron MG 2002 Apparent loss-of-function mutant GPCRs revealed as constitutively desensitized receptors. *Biochemistry* 41:11981–11989
- Shi W, Sports CD, Raman D, Shirakawa S, Osawa S, Weiss ER 1998 Rhodopsin arginine-135 mutants are phosphorylated by rhodopsin kinase and bind arrestin in the absence of 11-cis-retinal. *Biochemistry* 37: 4869–4874
- Charest PG, Bouvier M 2003 Palmitoylation of the V2 vasopressin receptor carboxyl tail enhances β -arrestin

- recruitment leading to efficient receptor endocytosis and ERK1/2 activation. *J Biol Chem* 278:41541–41551
14. Angers S, Salahpour A, Joly E, Hilaiet S, Chelsky D, Dennis M, Bouvier M 2000 Detection of β 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci USA* 97:3684–3689
 15. Mercier JF, Salahpour A, Angers S, Breit A, Bouvier M 2002 Quantitative assessment of β 1- and β 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 277:44925–44931
 16. Krupnick JG, Benovic JL 1998 The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:289–319
 17. Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Caron MG, Barak LS 2000 Differential affinities of visual arrestin, β arrestin1, and β arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem* 275:17201–17210
 18. Mollenhauer HH, Morre DJ, Rowe LD 1990 Alteration of intracellular traffic by monensin; mechanism, specificity and relationship to toxicity. *Biochim Biophys Acta* 1031:225–246
 19. Petaja-Repo UE, Hogue M, Laperriere A, Walker P, Bouvier M 2000 Export from the endoplasmic reticulum represents the limiting step in the maturation and cell surface expression of the human δ opioid receptor. *J Biol Chem* 275:13727–13736
 20. Miserey-Lenkei S, Parnot C, Bardin S, Corvol P, Clauser E 2002 Constitutive internalization of constitutively active angiotensin II AT(1A) receptor mutants is blocked by inverse agonists. *J Biol Chem* 277:5891–5901
 21. Hilaiet S, Belanger C, Bertrand J, Laperriere A, Foord SM, Bouvier M 2001 Agonist-promoted internalization of a ternary complex between calcitonin receptor-like receptor, receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1), and β -arrestin. *J Biol Chem* 276:42182–42190
 22. Cullen BR 1987 Use of eukaryotic expression technology in the functional analysis of cloned genes. *Methods Enzymol* 152:684–704
 23. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T 1989 Molecular cloning a laboratory manual. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press
 24. Wong YH, Federman A, Pace AM, Zachary I, Evans T, Pouyssegur J, Bourne HR 1991 Mutant α subunits of Gi2 inhibit cyclic AMP accumulation. *Nature* 351:63–65



Molecular Endocrinology is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

Discussion

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis de tester l'hypothèse que des antagonistes non-peptidiques des récepteurs de la vasopressine peuvent agir comme chaperon pharmacologique et le mécanisme d'action par lequel ils permettent la récupération de la fonction de certains récepteurs V2 mutants ainsi que leur potentiel thérapeutique chez des patients atteints de diabète insipide néphrogénique.

Nous avons d'abord démontré que des antagonistes non-peptidiques des récepteurs de la vasopressine (SR121463, VPA-985, SR49059 et YM087) peuvent agir comme chaperons pharmacologiques en permettant l'expression à la surface cellulaire et la récupération partielle de fonction des récepteurs V2 mutants responsables du diabète insipide néphrogénique. Nous avons ensuite validé que ces chaperons pharmacologiques agissent au niveau du réticulum endoplasmique en stabilisant une forme native ou quasi-native des récepteurs et diminuent leur dégradation prématurée. Finalement, nous avons démontré qu'un traitement de deux jours avec l'un de ces antagonistes, le SR49059, a partiellement rattrapé la fonction urinaire chez cinq patients atteints de diabète insipide néphrogénique.

Tous ces résultats suggèrent que les chaperons pharmacologiques offrent une nouvelle voie thérapeutique dans le traitement du diabète insipide néphrogénique ainsi que pour plusieurs autres maladies conformationnelles.

Les maladies conformationnelles résultent de mutations, pouvant être de simples mutations ponctuelles, qui affectent la structure tridimensionnelle de la protéine entraînant sa rétention dans le réticulum endoplasmique. Ces protéines sont retenues grâce au système très rigoureux de contrôle de qualité du réticulum endoplasmique. Ensuite, ces protéines seront soit prématurément dégradées par le protéasome ou elles formeront des agrégats toxiques pour la cellule.

Une de ces maladies conformationnelles est le diabète insipide néphrogénique. Cette pathologie entraîne une résistance des reins en réponse à l'hormone antidiurétique, l'arginine vasopressine, menant à une polyurie jusqu'à 20 litres d'urine par jour. Dans environ 90% des cas, la maladie est due à des mutations dans le gène du récepteur V2 de la vasopressine, situé sur le chromosome X. À ce jour, il existe plus de 170 mutations différentes dans ce récepteur responsables du phénotype de diabète insipide néphrogénique. Lorsqu'exprimé dans un système d'expression hétérologue, la majorité de ces récepteurs mutants sont retenus dans le réticulum endoplasmique afin d'être dégradés et ne peuvent atteindre la surface cellulaire pour exercer leur fonction.

Dans le passé, différents groupes de chercheurs ont tenté de trouver des façons de réchapper des récepteurs V2 mutants. Par exemple, le groupe de Schöneberg a tenté de sauver les récepteurs V2 mutants par une approche de complémentation fonctionnelle en exprimant des fragments de récepteurs correspondants aux régions mutantes. Ils ont donc co-exprimé un polypeptide, soit les 130 derniers acides aminés de la queue C-terminal du récepteur V2, avec les récepteurs mutants dans des cellules (Schoneberg et al., 1996; Schoneberg et al., 1997; Schulz et al., 2000). Quatre des six récepteurs tronqués (E242X,

804delG, 834delA et W284X) et un récepteur muté (Y280C) ont vu leur fonction récupérée quoique la quantité de récepteurs à la surface était faible. Le mécanisme proposé expliquant ce sauvetage fonctionnel serait une substitution par le fragment co-exprimé dans le cas des récepteurs tronqués. Cependant, dans le cas du récepteur portant la mutation Y280C, le mécanisme possible est moins évident, la dimérisation pourrait être en cause (Schulz et al., 2000). Cependant, l'administration de ce polypeptide chez des patients demeure un grand problème.

Plus tard, le groupe de Rosenthal a tenté de rattrapper la fonction de récepteurs V2 mutants portant les mutations G185C ou R202C. Ces mutations, par l'ajout d'une cystéine dans les boucles intracellulaires, entraînent la formation d'un nouveau pont disulfure avec les cystéines normalement présentes dans le récepteur, ce qui affectent la structure native du récepteur. Afin de rattrapper ces récepteurs mutants, ils ont enlevé une autre cystéine (C195A) dans le récepteur qui pourrait former le pont avec celles dues à la mutation (Schulein et al., 2001). Lorsque les deux mutations sont présentes (G185C et C195A) ou (R202C et C195A), les récepteurs sont fonctionnels, suggérant qu'un pont s'était bel et bien formé entre ces cystéines. Toutefois, cette approche n'est pas très prometteuse puisqu'elle s'applique seulement à deux mutations particulières et nécessite la thérapie génique.

Parallèlement à ces études, nous avons développé le concept de chaperon pharmacologique, de petites molécules permettant une manipulation du contrôle de qualité du réticulum endoplasmique. Cette thérapie semblait plus prometteuse puisqu'elle n'est pas spécifique à une mutation particulière, un grand avantage dans le cas du diabète insipide

néphrogénique car presque chaque famille présente une mutation différente, et ne nécessite aucune intervention, telle la thérapie génique.

Les premières évidences concernant une manipulation du contrôle de qualité du réticulum endoplasmique proviennent d'études avec le CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator). Des mutations dans ce canal du chlore sont responsables de la fibrose kystique, une inabilité des cellules épithéliales à sécréter le chlore. Environ 90% des patients atteints de la fibrose kystique portent la mutation $\Delta F508$ (délétion de la phénylalanine à la position 508) qui cause un mauvais repliement du canal, entraînant sa rétention dans le réticulum endoplasmique et sa dégradation rapide par le protéasome. Les premières études ont démontré qu'une diminution de la température de croissance des cellules exprimant le $\Delta F508$ CFTR permettait d'augmenter la quantité de canaux fonctionnels à la membrane (Denning et al., 1992). Ces résultats ont été interprétés comme un effet cinétique provenant du ralentissement du processus de repliement permettant à une plus grande proportion de canaux de se replier dans la bonne conformation.

Suite à ces observations, des composés à bas poids moléculaires, tels le glycérol, le triméthylamine N-oxyde ou l'eau deutérée, ont été testés en sachant qu'ils peuvent stabiliser les protéines. En accord avec l'effet cinétique de la température sur le repliement, ces composés ont eux aussi permis de rattrapper fonctionnellement les CFTR mutants (Brown et al., 1996; Sato et al., 1996). Ces composés ont été définis comme chaperons chimiques puisque l'hypothèse générale est que ces composés permettent de stabiliser la bonne conformation de la protéine qui permet d'échapper au contrôle de qualité du réticulum endoplasmique. Par la suite, un traitement avec les chaperons chimiques ont été utilisés dans

plusieurs cas de protéines mutantes impliquées dans des maladies conformationnelles (voir chapitre 4.1). Cependant, aucun chaperon chimique ne peut être utilisé chez les humains puisque ceux-ci sont toxiques en plus d'être non-spécifiques.

Ces études ont mené à l'utilisation de composés pouvant spécifiquement lier des protéines mutantes à l'intérieur de la cellule afin de permettre leur échappement du réticulum endoplasmique et être tolérés chez les humains. La spécificité est en fait un critère très important *in vivo* puisque l'augmentation de la maturation de plusieurs protéines peut être très néfaste. La première étude provient de travaux sur le transporteur P-glycoprotéine. Surprenamment, le traitement de transporteurs mutants, retenus dans le réticulum endoplasmique, avec des substrats et des inhibiteurs a permis de récupérer leur fonction (Loo and Clarke, 1995). Cet effet a été accompagné par une augmentation de la maturation de la protéine telle que démontré par l'accumulation de la forme glycosylée mature. L'hypothèse que l'occupation du site de liaison du transporteur stabilisait une conformation près de la conformation native pouvant passer le contrôle de qualité a donc été posée. Par la suite, quelques études ont démontré des résultats similaires avec des ligands spécifiques à chacune des protéines mutantes considérées (voir chapitre 4.1 et 4.2).

Suite aux études sur le transporteur P-glycoprotéine, nous avons posé l'hypothèse que des ligands spécifiques aux récepteurs de la vasopressine pourraient stabiliser les récepteurs V2 mutants et leur permettre de passer les contrôles de qualité du réticulum endoplasmique. Nous avons d'abord confirmé que les récepteurs mutants (L59P, del62-64, L83Q, Y128S, W164S, S167L, A294P, P322H, R337X) étaient bien retenus dans le réticulum endoplasmique puisque ceux-ci sont colocalisés parfaitement avec la calréticuline, une

protéine résidante du réticulum endoplasmique. Ensuite, nous avons démontré que deux antagonistes non-peptidiques des récepteurs V2 de la vasopressine, le SR121463 et le VPA-985, pouvaient augmenter l'expression à la surface cellulaire de ces récepteurs mutants. Puis, afin de savoir si les récepteurs mutants à la membrane sont fonctionnels, nous avons observé la liaison de la vasopressine et la fonction de ces récepteurs. Suite à une stimulation par la vasopressine, ces récepteurs sont bel et bien capable de stimuler l'adénylate cyclase par l'activation de la protéine $G\alpha_s$. Malgré le fait que la fonction fut observée, aucune liaison de la vasopressine marquée ne fut détectée. Ce manque de liaison peut s'expliquer de deux façons différentes. La première explication est que les récepteurs sont dans une conformation de basse affinité pour la vasopressine alors que la deuxième est que l'antagoniste bloque la liaison de la vasopressine une fois à la membrane puisque l'antagoniste est toujours lié au récepteur. Nous croyons que la deuxième explication est plus probable. D'abord, lorsque les récepteurs de type sauvage sont traités avec l'antagoniste, il est aussi impossible de détecter la liaison de la vasopressine marquée, suggérant que l'antagoniste bloque cette liaison. De plus, puisque l'essai utilisé afin de détecter la fonction des récepteurs est un système d'amplification, une petite proportion de récepteurs dissociés de l'antagoniste serait suffisante afin de discerner le signal.

Suite à tous ces résultats, deux hypothèses sur le mécanisme d'action des chaperons pharmacologiques s'offraient à nous. La première hypothèse est que les antagonistes stabilisent une faible proportion de récepteurs mutants à la membrane dans une conformation moins propice à l'internalisation et la dégradation, tel que démontré pour les récepteurs H2 de l'histamine (Smit et al., 1996) ou d'autres récepteurs constitutivement actifs (Gether et al., 1997a;Heinflink et al., 1995;Lee et al., 1997). La deuxième hypothèse est que

l'antagoniste lie le récepteur mutant à l'intérieur du réticulum endoplasmique et le stabilise dans une conformation qui va lui permettre de passer les contrôles de qualité et d'atteindre la surface cellulaire. Afin de discriminer entre ces deux hypothèses, nous avons utilisé un antagoniste peptidique, qui ne peut pénétrer la membrane. Si la récupération de fonction observée en présence de SR121463 est à la membrane, l'antagoniste peptidique pourrait aussi permettre cette récupération ou du moins la bloquer. En observant la capacité à stimuler la production d'AMPc de ces récepteurs mutants suite à une exposition à la vasopressine, nous avons confirmé que le SR121463 agit vraiment à l'intérieur de la cellule puisque l'antagoniste peptidique ne permet pas et ne bloque pas la récupération de la fonction des récepteurs mutants engendrée par le SR121463. Par la suite, afin de savoir si le SR121463 agit au niveau du réticulum endoplasmique, nous avons observé l'état de glycosylation des récepteurs. Comme l'état de glycosylation du récepteur est différent selon les compartiments par lesquels il a été acheminé, il est possible de savoir si un récepteur n'a pas quitté le réticulum endoplasmique (forme partiellement glycosylée) ou s'il est passé par l'appareil de Golgi (forme complètement glycosylée) puisque cette forme complètement glycosylée augmente le poids moléculaire du récepteur. Dans le cas des récepteurs mutants que nous étudions, ils sont tous que partiellement glycosylés et suite au traitement avec le SR121463, il y a apparition de la forme complètement glycosylée. Ces résultats indiquent que les récepteurs mutants en présence de l'antagoniste sont maintenant acheminés à la membrane par la voie traditionnelle de sécrétion, soit en passant par l'appareil de Golgi. Nous avons donc conclu que les antagonistes non-peptidiques agissent comme chaperons pharmacologiques en stabilisant les récepteurs mutants dans une conformation qui leur permet de franchir le contrôle de qualité du réticulum endoplasmique et d'atteindre la surface cellulaire pour exercer leur fonction. Cependant, une fois à la membrane, quand est-il de la stabilité des

récepteurs mutants. Il a été démontré que dans le cas du CFTR, une fois à la membrane en réduisant la température de croissance des cellules, ces canaux mutants sont moins stables que les canaux de type sauvage (Lukacs et al., 1993). Dans le cas des récepteurs V2, la stabilité de la protéine à la membrane n'a pas été étudiée directement mais certaines évidences nous portent à croire que la stabilité ne serait pas très affectée. Par exemple, 12 heures après avoir enlevé l'antagoniste, les récepteurs répondent toujours positivement à une stimulation par la vasopressine.

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action des chaperons pharmacologiques, nous avons poussé davantage les études avec un de ces antagonistes, le SR121463 sur les récepteurs V2 portant la mutation W164S. Tout d'abord, nous avons exploré les causes de la rétention intracellulaire. En prenant avantage de l'effet de la température de croissance des cellules sur la maturation des protéines mutantes, tel que décrit précédemment, nous voulions savoir si nos récepteurs mutants étaient mal repliés. Comme attendu, l'incubation de nos cellules exprimant des récepteurs V2 mutants à 30° degrés pendant 16 heures a permis de récupérer l'expression de ces récepteurs à la surface cellulaire, suggérant que la rétention était due à un mauvais repliement. Cette augmentation de l'expression des récepteurs mutants à la surface cellulaire est similaire à celle obtenue suite au traitement avec l'antagoniste et encore plus lorsque les deux furent utilisés. Le fait que le SR121463 permette une augmentation des récepteurs à la surface en plus de l'effet de la température est d'une part compatible avec le fait que la température permet un ralentissement du processus de repliement en laissant plus de temps aux récepteurs mutants pour se replier. D'autre part, en plus de la proportion de récepteurs rattrapés en réponse à une diminution de la température de croissance, une proportion est rattrapée par l'antagoniste. Ces résultats suggèrent que ces

récepteurs V2 mutants soient retenus dans le réticulum endoplasmique dû à un mauvais repliement de la protéine. Cependant, ce mauvais repliement ne semble pas être majeur puisque ces récepteurs peuvent toujours dimériser entre eux et avec les récepteurs de type sauvage. La dimérisation des récepteurs mutants avec les récepteurs de type sauvage n'est pas pertinente du point de vue physiologique puisque le gène du récepteur V2 est situé sur le chromosome X. Alors chez la femme hétérozygote par exemple, il y a environ 50% des cellules qui expriment le récepteur mutant et environ 50% des cellules qui expriment le récepteur de type sauvage, les deux types de récepteurs ne peuvent pas se retrouver dans la même cellule due à l'inactivation d'un des chromosome X. Le fait que les récepteurs mutants ne dimérisent pas avec les récepteurs GABA_BR2 mais peuvent dimériser avec les récepteurs V2 de type sauvage supporte la spécificité de la dimérisation et exclut l'hypothèse de l'aggrégation dans le réticulum endoplasmique. Nos résultats appuient aussi l'hypothèse que la dimérisation se produit très tôt lors de la biosynthèse comme cela fut précédemment suggéré (Salahpour et al., 2004; Terrillon et al., 2003). Alors, un petit changement dans la structure tridimensionnelle serait suffisant pour que ces récepteurs soient reconnus par le contrôle de qualité du réticulum endoplasmique afin d'accélérer leur dégradation par le protéasome.

Cette dégradation prématurée n'a pas été montrée directement dans cette thèse mais le taux d'ubiquitination quant à lui a été observé. Puisque le taux d'ubiquitination est un indice de la quantité de récepteurs ciblés pour la dégradation par le protéasome, le fait que nos récepteurs mutants soient très ubiquitinés nous suggère que ceux-ci seraient dégradés par le protéasome. De plus, le traitement avec le SR121463 diminue ce niveau basal d'ubiquitination. Ce résultat suggère que le SR121463 agit au niveau du réticulum

endoplasmique puisque l'antagoniste affecte un événement dans ce compartiment. Cependant, deux hypothèses sur le mécanisme du SR121463 peuvent expliquer ce résultat. Premièrement, la liaison du SR121463 stabilise une conformation intermédiaire qui va laisser plus de temps au récepteur pour se replier, résultant en une diminution de récepteurs ciblés pour la dégradation. Ce mécanisme est similaire avec l'effet de la température sur la maturation des protéines mutantes. Deuxièmement, la liaison du SR121463 favorise le repliement des récepteurs en une conformation native ou quasi-native menant à l'export du réticulum endoplasmique et la maturation d'une plus grande proportion de récepteurs. Ces deux hypothèses auraient des effets contraires sur les interactions entre les récepteurs mutants et les chaperons moléculaires qui interviennent dans le processus de repliement. En effet, la stabilisation de formes intermédiaires du récepteur devrait augmenter la durée d'interaction avec les chaperons moléculaires qui assistent le repliement alors que la stabilisation d'une conformation native ou quasi-native devraient diminuer la durée de ces interactions.

Afin de distinguer entre les deux hypothèses du mécanisme d'action des chaperons pharmacologiques, nous avons observé l'effet de l'antagoniste sur un des chaperons moléculaires, la calnexine, puisque celle-ci interagit avec le récepteur V2 de la vasopressine (Morello et al., 2000). Le traitement avec le SR121463 a donc permis de diminuer la quantité de calnexine co-immunoprécipitée avec les récepteurs mutants. Ce résultat supporte l'hypothèse que l'antagoniste favorise l'export du réticulum endoplasmique suite à la stabilisation d'une conformation native ou quasi-native du récepteur puisque celui-ci interagit moins avec la calnexine. Par ailleurs, les récepteurs V2 mutants interagissent plus longtemps avec la calnexine que les récepteurs de type sauvage puisque la calnexine va tenter d'assister

le repliement (Morello et al., 2000). Ce temps d'interaction prolongé entre les récepteurs mutants et la calnexine a été diminué suite au traitement avec l'antagoniste. Lorsque le SR121463 stabilise une forme native ou quasi-native du récepteur mutant, celui-ci n'a plus besoin de l'aide de la calnexine et peut donc s'en dissocier plus rapidement. Il serait aussi possible d'observer si la conformation du récepteur est vraiment changée suite à la liaison du chaperon pharmacologique en observant son patron protéolytique. Ces résultats suggèrent que les chaperons pharmacologiques agissent avant la dissociation de la calnexine du récepteur.

Les résultats précédents indiquent qu'il est possible de positionner certains événements de la cascade à partir du repliement initial jusqu'à l'export du réticulum endoplasmique selon l'effet des chaperons pharmacologiques sur ces événements. Il a été suggéré que la protéine résidente du réticulum endoplasmique DRiP78 agissent comme protéine d'export du réticulum endoplasmique pour certains récepteurs couplés aux protéines G (Bermak et al., 2001). En effet, DRiP78 lie une séquence hydrophobe spécifique de l'extrémité C-terminal très conservée chez les récepteurs de cette famille, soit FxxxFxxxF. Cependant, une autre étude démontre que la région du récepteur impliquée dans la liaison à DRiP78 est importante pour le repliement plutôt que l'export (Krause et al., 2000) posant la question quant au rôle exact de DRiP78. D'ailleurs, très peu de résultats, soit deux articles, ont été publiés au sujet de cette nouvelle protéine. De plus, ces deux articles présentent des résultats en apparence contradictoires. Le premier article discute de l'identification de DRiP78 comme une nouvelle protéine permettant l'export de récepteurs couplés aux protéines G (Bermak et al., 2001). Dans cet article, le groupe de Zhou a d'abord démontré que le motif FxxxFxxxF du récepteur D1 dopaminergique est un motif d'export. Puis, la surexpression ou la séquestration de DRiP78, qui lie ce motif, entraîne la rétention des

récepteurs D1 dopaminergique et M2 muscarinique. Ils ont conclu que DRiP78 est impliquée dans le transport de ces récepteurs et que le niveau d'expression endogène de DRiP78 est crucial. Le deuxième article, quant à lui, démontre que la surexpression de DRiP78 augmente la maturation des récepteurs de l'angiotensine de type 1A (Leclerc et al., 2002). Ces différences dans le transport des récepteurs ne sont pas dues à des niveaux d'expression différents de DRiP78. De plus, la spécificité de l'effet a bien été validée puisque DRiP78 n'a plus aucun effet lorsque le motif FxxxFxxxF de ces récepteurs est muté pour le motif AxxxAxxxA. Dans le cas des récepteurs V2 de la vasopressine, nous avons montré que DRiP78 pouvait interagir avec ces récepteurs et même la forme mutante peut interagir avec DRiP78. Ce premier résultat a d'abord été étonnant puisque, comme DRiP78 pourrait être une protéine d'export, il aurait été attendu qu'elle n'interagisse pas avec les récepteurs mutants qui ne peuvent être exportés. Cependant, il serait possible que les récepteurs mutants puissent atteindre le cargo pour l'export mais s'ils sont mal repliés, qu'ils soient ensuite ciblés pour la dégradation par le clivage d'un mannose. Puis, nous avons regardé l'effet de la surexpression de DRiP78 sur la maturation des récepteurs V2. Dans le cas des récepteurs de type sauvages, suite à la surexpression de DRiP78, il y a une augmentation de la maturation, tandis que dans le cas des récepteurs mutants, il n'y a aucun effet de la surexpression de DRiP78 sur la maturation. Ces résultats suggèrent que DRiP78 permet d'augmenter la maturation des récepteurs de type sauvage mais n'est pas suffisant pour corriger le mauvais repliement des récepteurs mutants. Comme il nous était surprenant que DRiP78 puisse interagir avec les récepteurs mutants en étant une protéine d'export, nous avons utilisé les chaperons pharmacologiques afin de tenter de positionner DRiP78 dans le contrôle de qualité. En effet, si DRiP78 est une protéine d'export, le chaperon pharmacologique devrait affecter l'interaction de DRiP78 avec le récepteur mutant puisque

DRiP78 agirait en aval de la calnexine. Cependant, s'il n'y a pas d'effet du chaperon pharmacologique sur l'interaction de DRiP78 avec les récepteurs mutants, cela pourrait suggérer que DRiP78 agirait en amont de la calnexine. Nous avons donc observé qu'un traitement avec le SR121463 n'affecte pas du tout l'interaction des récepteurs de type sauvage et mutants avec DRiP78. Ce dernier résultat suggère que DRiP78 agirait en amont du complexe de la calnexine puisque ce complexe peut être modulé par l'antagoniste. Si DRiP78 agissait comme protéine d'export, ce serait assurément en aval de la calnexine. Tous ces résultats laissent croire que DRiP78 ne serait peut-être pas une protéine d'export mais plutôt un chaperon moléculaire. Par exemple, une des hypothèses serait que DRiP78 pourrait agir de concert avec le complexe de BiP puisque celui-ci agit co-traductionnellement avant l'arrivée de la calnexine. De plus, les résultats obtenus dans les deux premiers articles discutant DRiP78 sont compatibles avec un rôle de chaperon moléculaire de DRiP78. En effet, les différents effets de la surexpression de DRiP78 sur la maturation des récepteurs sont maintenant plausibles puisqu'il fut déjà démontré que selon la protéine observée, la surexpression des chaperons moléculaires peut soit augmenter l'export ou retenir la protéine dans le réticulum endoplasmique (Butz et al., 2003; Conesa et al., 2002; Jackson et al., 1994; Okiyoneda et al., 2004; Reddy and Corley, 1998; Siffroi-Fernandez et al., 2002).

Le mécanisme général des antagonistes que nous suggérons est le suivant (Figure 29). Les antagonistes pénètrent la membrane et atteignent le réticulum endoplasmique. À cet endroit, ils vont lier le récepteur instable en voie de repliement, probablement pendant que le récepteur lie le complexe de la calnexine, afin de le stabiliser dans une conformation native ou quasi-native. Alors, le récepteur va pouvoir être reconnu comme bien replié par l'UDP-glucose : glycoprotéine glucosyltransférase afin d'éviter qu'il se réassocie avec la calnexine et

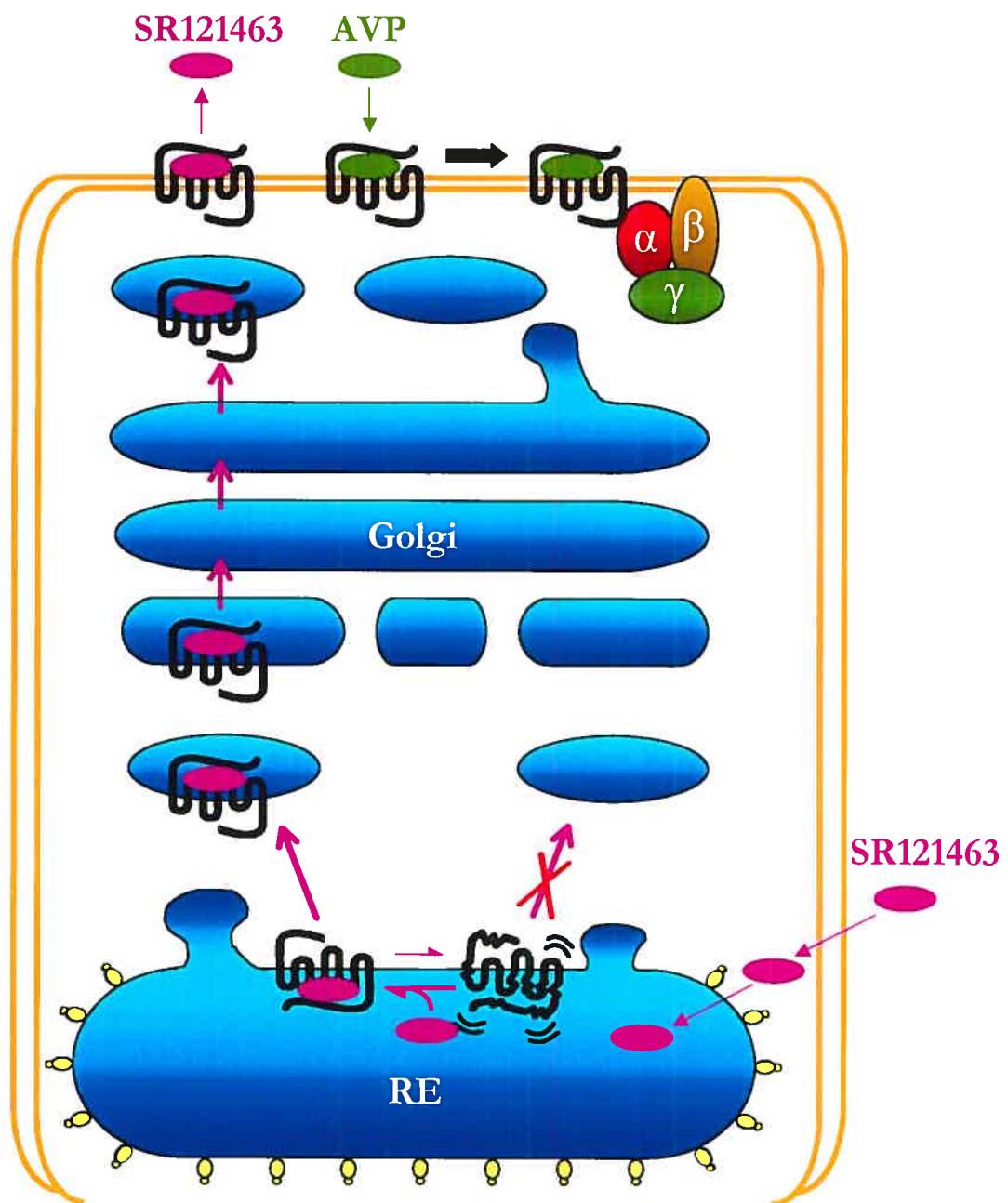


Figure 29 : Hypothèse du mécanisme d'action des chaperons pharmacologiques

qu'il soit ciblé pour la dégradation. Finalement, le récepteur va être acheminé à la membrane et l'antagoniste devra se dissocier du récepteur pour permettre à la vasopressine de se lier et d'activer le récepteur.

L'utilisation d'antagonistes afin de rattraper la fonction de récepteurs mutants pourrait paraître aberrante. En effet, le rôle des antagonistes à la base est de bloquer l'activation du récepteur alors que notre but recherché est d'augmenter l'activité de ces récepteurs mutants. Afin de palier à ce problème, lors de nos expériences, nous devions laver intensivement l'antagoniste avant de pouvoir stimuler nos récepteurs avec la vasopressine. Alors, la dissociation lente de l'antagoniste une fois à la membrane, dû à sa grande affinité pour le récepteur V2 de la vasopressine (similaire à l'affinité de la vasopressine), pourrait compromettre son utilisation chez des patients en bloquant de façon chronique le récepteur. Afin de surmonter ce problème, nous avons posé l'hypothèse que des antagonistes ayant une plus faible affinité pour les récepteurs V2 de la vasopressine pourraient être de meilleurs candidats thérapeutiques. Nous avons donc utilisé le SR49059, un antagoniste des récepteurs V1a de la vasopressine, étant 100 fois moins affin pour le récepteur V2 que la vasopressine (Serradeil-Le Gal et al., 1993). En observant l'expression à la surface cellulaire et la fonction de nos récepteurs mutants suite à un traitement avec le SR49059, nous avons pu démontrer que le SR49059 pouvait lui aussi agir comme chaperon pharmacologique.

Le SR49059 est un composé qui était déjà en études cliniques, ce qui avait d'ailleurs influencé notre choix pour ce composé. Le SR49059 a été développé dans le but de bloquer les récepteurs V1a chez les patients hypertendus dus à une sécrétion excessive de vasopressine (Thibonnier et al., 1999). Chez des gens normaux, cet antagoniste n'a

absolument aucun effet ni sur la pression artérielle ni sur les fréquences cardiaques. Afin de tester le potentiel thérapeutique du SR49059 chez des patients atteints de diabète insipide néphrogénique, nous avons tiré avantage du fait que certains de ces patients avaient été diagnostiqués par le Dr Daniel Bichet. De plus, comme le SR49059 avait déjà passé les études de toxicologie, nous avons eu l'autorisation de le tester chez cinq patients consentants. Ces patients ont été hospitalisés à l'hôpital du Sacré-Cœur de Montréal pour trois jours afin de recevoir deux jours de traitement avec le SR49059. Dans les cinq cas, la fonction rénale a été améliorée, telle qu'indiquée par la diminution du volume urinaire et l'augmentation de l'osmolalité urinaire au tableau 3, sans changement de la pression artérielle ni de la fréquence cardiaque. Afin de supporter que les patients n'ont pas volontairement diminué la quantité d'eau absorbée, aucune élévation du taux plasmatique de sodium n'a été détectée. Les effets bénéfiques du traitement ont commencé de trois à six heures après l'administration du SR49059, compatible avec le mécanisme d'action suggéré puisque l'antagoniste doit d'abord pénétrer la cellule afin de permettre le bon repliement et l'acheminement à la membrane. Par la suite, deux patients ont été testés pendant 7 jours et l'effet du SR49059 a été soutenu tout au long de cette période.

Mutations	Volume urinaire		Osmolalité urinaire	
	Jour 1	Jour 3	Jour 1	Jour 3
del 62-64	14 litres	10 litres	60 mmol/kg	95 mmol/kg
R137H	20 litres	13 litres	90 mmol/kg	260 mmol/kg
R137H	5.4 litres	3 litres	200 mmol/kg	450 mmol/kg
R137H	7 litres	4 litres	150 mmol/kg	450 mmol/kg
W164S	16 litres	13 litres	60 mmol/kg	120 mmol/kg

Tableau 3 : Effet de l'administration du SR49059 chez des patients atteints de diabète insipide néphrogénique

Parmi les patients qui ont répondu positivement au traitement avec le SR49059, trois patients portaient la mutation R137H. Suite à notre étude, le groupe de Marc Caron à l'université Duke a démontré que les récepteurs V2 de la vasopressine portant la mutation R137H sont constitutivement désensibilisés une fois à la membrane (Barak et al., 2001). Ils ont d'abord démontré une localisation de ces récepteurs dans les vésicules endocytotiques, compatible avec leur internalisation. Puis, ils ont observé que la β -arrestine en présence de ces récepteurs mutants était localisée à la membrane plasmique alors qu'elle est diffuse dans le cytosol en présence des récepteurs de type sauvage. Finalement, ils ont montré que les récepteurs mutants sont constitutivement phosphorylés même en absence d'agoniste. Tous ces résultats suggèrent que les récepteurs V2 portant la mutation R137H sont constitutivement phosphorylés et qu'une fois à la membrane, ils recrutent la β -arrestine menant à leur internalisation. Par des expériences de BRET, nous avons confirmé le recrutement constitutif de la β -arrestine aux récepteurs mutants. Cependant, ces récepteurs

mutants semblent recruter la β -arrestine avec une plus basse affinité que les récepteurs de type sauvage suite à une stimulation avec l'agoniste. Ces résultats sont en accord avec des études précédentes démontrant que lorsque les récepteurs sont en liaison avec l'agoniste et phosphorylés, ils recrutent la β -arrestine avec une haute affinité alors que les récepteurs en liaison avec l'agoniste mais ne pouvant pas être phosphorylés recrutent la β -arrestine avec une basse affinité (Krupnick and Benovic, 1998; Oakley et al., 2000). Ces études suggèrent que la liaison de l'agoniste et la phosphorylation sont nécessaires pour recruter la β -arrestine avec une haute affinité. Il serait donc possible d'imaginer que les récepteurs V2 portant la mutation R137H qui sont phosphorylés en l'absence de la liaison de l'agoniste pourraient recruter la β -arrestine avec une basse affinité. Ces résultats suggèrent que le récepteur portant la mutation R137H n'imité pas complètement la forme active du récepteur lié au ligand puisque celle-ci recruterait la β -arrestine avec une haute affinité. Il semble donc que les points de repère conformationnelles en réponse à la liaison du ligand et la phosphorylation soient reconnus par différents domaines de la β -arrestine.

Comme nos patients portant cette mutation répondaient bien au traitement avec le SR49059, nous voulions savoir qu'elle était le mécanisme d'action des chaperons pharmacologiques dans ce cas particulier. Nous avons d'abord posé l'hypothèse que l'antagoniste pouvait inhiber la désensibilisation constitutive en stabilisant les récepteurs mutants à la membrane. Pour ce faire, nous avons regardé le recrutement de la β -arrestine et l'internalisation de ces récepteurs mutants suite au traitement avec l'antagoniste. Grâce à des expériences d'immunofluorescence et de BRET, nous avons observé que l'antagoniste ne diminue pas du tout l'internalisation et le recrutement de la β -arrestine au récepteur. En fait,

le pré-traitement avec l'antagoniste permet même d'augmenter la quantité de récepteurs pouvant recruter la β -arrestine.

Puisque nous avons observé que le SR49059 ne diminuait pas le recrutement de la β -arrestine, nous avons posé l'hypothèse que la récupération de fonction chez les patients pouvait provenir de l'effet de chaperon pharmacologique du SR49059 en permettant à une plus grande proportion de récepteurs d'atteindre la surface cellulaire. Nous avons déjà remarqué que simplement une petite portion des récepteurs mutants pouvaient atteindre la surface cellulaire et ces récepteurs une fois à la membrane étaient constitutivement désensibilisés. En accord avec ce dernier résultat, nous avons démontré que l'effet du SR49059 se produit bel et bien au niveau du réticulum endoplasmique et qu'il permet d'augmenter la maturation des récepteurs mutants à travers l'appareil de Golgi. Ainsi, le SR49059 permet à une partie des récepteurs mutants encore dans le réticulum endoplasmique d'atteindre une conformation native ou quasi-native afin d'accéder la surface cellulaire et être activés par la vasopressine, expliquant la récupération partielle de la fonction de concentration de l'urine chez les patients portant la mutation R137H. De plus, il aurait été logique de penser que ces patients auraient moins bien répondu au traitement avec le SR49059 puisque plusieurs récepteurs une fois à la membrane sont endocytosés. Pourtant, les trois patients portant la mutation R137H sont ceux qui répondent le mieux au traitement. Cela nous démontre bien que plusieurs autres facteurs pourraient jouer un rôle lorsqu'il est question d'un organisme entier. Cependant, nous ne pouvons pas exclure qu'une autre voie de signalisation que celle par l'activation de l'adénylate cyclase pourrait être activée et contribuer à l'effet observé chez les patients. Par exemple, la voie des MAPK pourrait

contribuer puisque le SR121463 permet une petite activation des MAPK en liant le récepteur V2 et les aquaporine-2 présente un site de phosphorylation par les MAPK.

Toutefois, les études cliniques avec le SR49059 ont dû être interrompu pour des raisons indépendantes de notre étude. En fait, le SR49059 pourrait interagir avec la voie métabolique CYP3A4. Pour cette raison, nous devons trouver un nouvel antagoniste afin de poursuivre nos études. Le nouvel antagoniste que nous avons testé est le YM087 (conivaptan), un antagoniste des récepteurs V1a/V2 de la vasopressine (Tahara et al., 1997), développé aussi pour l'hypertension en réponse à une grande sécrétion de la vasopressine (Decaux, 2001; Martinez-Castelao, 2002; Udelson et al., 2001). Comme les autres antagonistes testés, le YM087 permet l'expression à la surface cellulaire et la récupération fonctionnelle de plusieurs récepteurs V2 mutants retenus dans le réticulum endoplasmique, ce qui nous offre un nouveau médicament à tester chez des patients atteints de diabète insipide néphrogénique.

Il est certain que l'effet observé chez les patients avec le SR49059 n'est que partiel puisque les patients ne retrouvent pas une osmolarité urinaire ni un volume d'urine observés chez les gens normaux. Nous croyons que cela peut être dû à une multitude de facteurs. Par exemple, les antagonistes ne permettent pas une récupération complète des récepteurs à la membrane et la mauvaise dissociation de l'antagoniste du récepteur une fois à la membrane bloque l'accès de la vasopressine. En effet, nous croyons que l'effet de l'antagoniste dans l'acheminement des récepteurs à la surface cellulaire est supérieur à l'effet observé dans la fonction mais que la présence prolongée de l'antagoniste au récepteur empêche en partie son activation. Pour cette raison, il serait intéressant de trouver un antagoniste ayant une affinité

pour les récepteurs V2 de la vasopressine encore plus faible, quoiqu'elle doit tout de même être assez élevée pour lier le récepteur. Avec un tel composé, il est possible que la dissociation de l'antagoniste une fois à la membrane soit plus facile. Une autre façon de contrer ce problème serait d'utiliser un agoniste partiel, comme cela fut démontré pour les récepteurs δ -opioïde (Petaja-Repo et al., 2002). En effet, il a été démontré qu'autant les agonistes que les antagonistes peuvent agir comme chaperons pharmacologiques. Dans ce cas, aucune dissociation du ligand une fois à la membrane est nécessaire. Cependant, l'agoniste doit être partiel afin d'éviter une trop grande activation menant à une régulation négative des récepteurs à la membrane (Petaja-Repo et al., 2002). Dans cette étude, la récupération fonctionnelle fut démontré aussi pour des récepteurs de type sauvage, puisque l'efficacité de la maturation du récepteur δ -opioïde est moins de 50%. Le fait que les chaperons pharmacologiques peuvent augmenter la maturation des récepteurs de type sauvage est très intéressant et accroît les possibilités d'utilisation des chaperons pharmacologiques. Cependant, cela doit être pris en considération lors de l'utilisation d'antagonistes non-peptidiques dans le blocage de récepteurs car les chaperons pharmacologiques peuvent aussi augmenter leur expression à la surface, par exemple, l'utilisation de β -bloqueurs dans le traitement de la défaillance cardiaque.

En résumé, jusqu'à présent, 4 antagonistes différents ont été testés et pour ces 4 antagonistes, la même série de récepteurs mutants ont vu leur expression à la surface cellulaire et leur fonction récupérées (Tableau 4). De plus, la fonction des récepteurs a été réchappée pour 11 sur 17 mutations entraînant une rétention intracellulaire des récepteurs. Il y a seulement quelques différences dans l'efficacité de l'antagoniste à réchapper les différentes mutations. Tous ces résultats démontrent une certaine généralité du concept de

chaperon pharmacologique et que c'est la sévérité du phénotype de la mutation qui détermine si le sauvetage est possible et non l'antagoniste utilisé. De plus, ces résultats sont très prometteurs puisqu'un seul composé peut réchapper plusieurs mutations différentes d'une même protéine, ce qui est essentiel dans le cas d'une maladie comme le diabète insipide néphrogénique où presque chaque famille présente une mutation différente. Finalement, tous les récepteurs dont l'expression à la surface cellulaire a été sauvée sont fonctionnels, suggérant que soit les récepteurs mutants doivent adopter une conformation native afin d'échapper le réticulum endoplasmique ou soit les récepteurs sont fonctionnels dans le réticulum endoplasmique mais leur export est compromis d   à une conformation pas tout à fait native.

En conclusion, nous avons démontré que des traitements avec des antagonistes non-peptidiques des récepteurs de la vasopressine permettent d'augmenter l'expression à la surface cellulaire et la fonction de récepteurs V2 mutants retenus dans le réticulum endoplasmique et responsables du diabète insipide néphrogénique. Ces chaperons pharmacologiques agissent spécifiquement en stabilisant les récepteurs mutants dans une conformation native ou quasi-native leur permettant d'échapper aux contrôles de qualité du réticulum endoplasmique. De plus, ces chaperons pharmacologiques permettent la récupération partielle de la fonction rénale chez des patients atteints du diabète insipide néphrogénique. Finalement, nous avons démontré une certaine généralité de ce concept de chaperons pharmacologiques puisque plusieurs antagonistes différents permettent la récupération fonctionnelle de la même série de récepteurs mutants, représentant plus de 50% des mutations testées.

Tableau 4 : Effet de différents chaperons pharmacologiques (SR121463, VPA-985, SR49059 et YM087) sur l'expression à la surface cellulaire et l'accumulation d'AMPc de récepteurs V2 de la vasopressine mutants.

Les mutations entraînant une rétention dans le réticulum endoplasmique et dont les récepteurs ont été réchappés par les chaperons pharmacologiques sont indiqués en **gras**.

	Immunofluorescence à la surface cellulaire			Accumulation d'AMPc (% d'augmentation)				
	Contrôle	SR121463	SR49059	YM087	SR121463	VPA-985	SR49059	YM087
N55H	Non	Non	Non	-	0%	0%	0%	-
L59P	Non	Oui	Oui	Oui	11590%	853%	360%	708%
del62-64	Non	Oui	Oui	Oui	1427%	222%	115%	381%
W71X	Non	Non	Non	Non	0%	0%	0%	0%
L83Q	Non	Oui	Oui	Oui	2645%	1763%	500%	294%
D85N	Oui	Oui	Oui	Oui	153%	0%	0%	0%
V88M	Oui	Oui	Oui	Oui	94%	0%	0%	0%
R113W	Oui	-	Oui	Oui	-	-	-	0%
Y128S	Partiel	Oui	Oui	Oui	540%	298%	60%	43%
D136A	Oui	Oui	Oui	-	195%	-	60%	-
R137H	Non	Oui	Oui	Oui	-	-	80%	492%
C142W/R143G	Non	Non	Non	-	0%	0%	0%	-
W164S	Non	-	Oui	Oui	-	-	400%	1400%
A165D	Non	-	Non	Oui	-	-	-	393%
S167L	Non	Non	Oui	Oui	4380%	849%	99%	356%
Y180L	Non	Non	Non	-	0%	0%	0%	-
I209F	Non	Non	Non	Non	0%	0%	0%	0%
W284X	Non	-	Non	Non	-	-	0%	0%
A294P	Non	Oui	Oui	Oui	1685%	411%	100%	152%
S315R	Oui	-	Oui	Oui	0%	0%	0%	0%
P322H	Non	Oui	Oui	-	2291%	11130%	107%	387%
R337X	Non	Oui	Oui	Oui	121%	7%	0%	-

Références

1. Agre,P., King,L.S., Yasui,M., Guggino,W.B., Ottersen,O.P., Fujiyoshi,Y., Engel,A., and Nielsen,S. (2002). Aquaporin water channels--from atomic structure to clinical medicine. *J.Physiol* 542, 3-16.
2. Agre,P., Sasaki,S., and Chrispeels,M.J. (1993). Aquaporins: a family of water channel proteins. *Am.J.Physiol* 265, F461.
3. Ala,Y., Morin,D., Mouillac,B., Sabatier,N., Vargas,R., Cotte, Dechaux,M., Antignac,C., Arthus,M.F., Lonergan,M., Turner,M.S., Balestre, MN, Alonso,G., Hibert,M., Barberis,C., Hendy,G.N., Bichet,D.G., and Jard,S. (1998). Functional studies of twelve mutant V2 vasopressin receptors related to nephrogenic diabetes insipidus: molecular basis of a mild clinical phenotype. *Journal of the American Society of Nephrology* 9, 1861-1872.
4. Aldecoa,A., Gujer,R., Fischer,J.A., and Born,W. (2000). Mammalian calcitonin receptor-like receptor/receptor activity modifying protein complexes define calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin receptors in *Drosophila* Schneider 2 cells. *FEBS Lett.* 471, 156-160.
5. Angers,S., Salahpour,A., and Bouvier,M. (2002). Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 42, 409-435.
6. Antoni,F.A. (1984). Novel ligand specificity of pituitary vasopressin receptors in the rat. *Neuroendocrinology* 39, 186-188.

7. Appenzeller,C., Andersson,H., Kappeler,F., and Hauri,H.P. (1999). The lectin ERGIC-53 is a cargo transport receptor for glycoproteins. *Nat.Cell Biol.* *1*, 330-334.
8. Aridor,M., Fish,K.N., Bannykh,S., Weissman,J., Roberts,T.H., Lippincott-Schwartz,J., and Balch,W.E. (2001). The Sar1 GTPase coordinates biosynthetic cargo selection with endoplasmic reticulum export site assembly. *J.Cell Biol.* *152*, 213-229.
9. Aridor,M. and Traub,L.M. (2002). Cargo selection in vesicular transport: the making and breaking of a coat. *Traffic.* *3*, 537-546.
10. Arthus,M.F., Lonergan,M., Crumley,M.J., Naumova,A.K., Morin,D., De Marco,L.A., Kaplan,B.S., Robertson,G.L., Sasaki,S., Morgan,K., Bichet,D.G., and Fujiwara,T.M. (2000). Report of 33 novel AVPR2 mutations and analysis of 117 families with X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *J.Am.Soc.Nephrol.* *11*, 1044-1054.
11. Attramadal,H., Arriza,J.L., Aoki,C., Dawson,T.M., Codina,J., Kwatra,M.M., Snyder,S.H., Caron,M.G., and Lefkowitz,R.J. (1992). Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family. *J.Biol.Chem.* *267*, 17882-17890.
12. Balow,J.P., Weissman,J.D., and Kearse,K.P. (1995). Unique expression of major histocompatibility complex class I proteins in the absence of glucose trimming and calnexin association. *J.Biol.Chem.* *270*, 29025-29029.
13. Bankir,L. (2001). Antidiuretic action of vasopressin: quantitative aspects and interaction between V1a and V2 receptor-mediated effects. *Cardiovasc.Res.* *51*, 372-390.

14. Barak,L.S., Ferguson,S.S., Zhang,J., and Caron,M.G. (1997). A beta-arrestin/green fluorescent protein biosensor for detecting G protein-coupled receptor activation. *J.Biol.Chem.* 272, 27497-27500.
15. Barak,L.S., Oakley,R.H., Laporte,S.A., and Caron,M.G. (2001). Constitutive arrestin-mediated desensitization of a human vasopressin receptor mutant associated with nephrogenic diabetes insipidus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 93-98.
16. Barlowe,C., Orci,L., Yeung,T., Hosobuchi,M., Hamamoto,S., Salama,N., Rexach,M.F., Ravazzola,M., Amherdt,M., and Schekman,R. (1994). COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *CELL* 77, 895-907.
17. Barlowe,C. and Schekman,R. (1993). SEC12 encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER. *Nature* 365, 347-349.
18. Bays,N.W. and Hampton,R.Y. (2002). Cdc48-Ufd1-Npl4: stuck in the middle with Ub. *Curr.Biol.* 12, R366-R371.
19. Benovic,J.L., Pike,L.J., Cerione,R.A., Staniszewski,C., Yoshimasa,T., Codina,J., Caron,M.G., and Lefkowitz,R.J. (1985). Phosphorylation of the mammalian β -adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase: Regulation of the rate of receptor phosphorylation and dephosphorylation by agonist occupancy and effects on coupling of the receptor to the stimulatory guanine nucleotide regulatory protein. *J.Biol.Chem.* 260, 7094-7101.

20. Bermak,J.C., Li,M., Bullock,C., and Zhou,Q.Y. (2001). Regulation of transport of the dopamine D1 receptor by a new membrane-associated ER protein. *Nat.Cell Biol.* 3, 492-498.
21. Bermak,J.C. and Zhou,Q.Y. (2001). Accessory proteins in the biogenesis of G protein-coupled receptors. *Mol.Intervent.* 1, 282-287.
22. Bernier,V., Lagace,M., Lonergan,M., Arthus,M.F., Bichet,D.G., and Bouvier,M. (2004). Functional Rescue of the Constitutively Internalized V2 Vasopressin Receptor Mutant R137H by the Pharmacological Chaperone Action of SR49059. *Mol.Endocrinol.*
23. Berridge,M.J. (2002). The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium* 32, 235-249.
24. Bichet,D.G., Arthus,M.F., Lonergan,M., Hendy,G.N., Paradis,A.J., Fujiwara,T.M., Morgan,K., Gregory,M.C., Rosenthal,W., Didwania,A., Antaramian,A., and Birnbaumer,M. (1993). X-linked nephrogenic diabetes insipidus mutations in north america and the Hopewell hypothesis. *J.Clin.Invest.* 92, 1262-1268.
25. Bichet,D.G., Hendy,G.N., Lonergan,M., Arthus,M.F., Ligier,S., Pausova,Z., Kluge,R., Zingg,H., Saenger,P., Oppenheimer,E., Hirsch,D.J., Gilgenkrantz,S., Salles,J.P., Oberle,I., Mandel,J.L., Gregory,M.C., Fujiwara,T.M., Morgan,K., and Scriver,C.R. (1992). X-linked diabetes insipidus: from the ship hopewell to restriction fragment length polymorphism studies. *Am.J.Hum.Genet.* 51, 1089-1102.

26. Birnbaumer,M., Gilbert,S., and Rosenthal,W. (1994). An extracellular congenital nephrogenic diabetes insipidus mutation of the vasopressin receptor reduces cell surface expression, affinity for ligand, and coupling to the Gs/adenylyl cyclase system. *Mol.Endo.* *8*, 886-894.
27. Birnbaumer,M., Seibold,A., Gilbert,S., Ishido,M., Barberis,C., Antaramian,A., Bradet,P., and Rosenthal,W. (1992). Molecular cloning of the receptor to human antidiuretic hormone. *Nature* *357*, 333-335.
28. Blalock,T., Gerron,G., Quiter,E., and Rudman,D. (1977). Role of diet in the management of vasopressin-responsive and -resistant diabetes insipidus. *Am.J.Clin.Nutr.* *30*, 1070-1076.
29. Blond-Elguindi,S., Cwirla,S.E., Dower,W.J., Lipshutz,R.J., Sprang,S.R., Sambrook,J.F., and Gething,M.J. (1993a). Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP. *CELL* *75*, 717-728.
30. Blond-Elguindi,S., Fourie,A.M., Sambrook,J.F., and Gething,M.J. (1993b). Peptide-dependent stimulation of the ATPase activity of the molecular chaperone BiP is the result of conversion of oligomers to active monomers. *J.Biol.Chem.* *268*, 12730-12735.
31. Bockaert,J. and Pin,J.P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. [Review] [56 refs]. *EMBO J* *18*, 1723-1729.

32. Booth,C. and Koch,G.L. (1989). Perturbation of cellular calcium induces secretion of luminal ER proteins. *CELL* 59, 729-737.
33. Bourque,C.W. and Oliet,S.H. (1997). Osmoreceptors in the central nervous system. *Annu.Rev.Physiol* 59, 601-619.
34. Bourque,C.W., Oliet,S.H., and Richard,D. (1994). Osmoreceptors, osmoreception, and osmoregulation. *Front Neuroendocrinol.* 15, 231-274.
35. Bouvier,M., Hausdorff,W.P., De Blasi,A., O'Dowd,B.F., Kobilka,B.K., Caron,M.G., and Lefkowitz,R.J. (1988). Removal of phosphorylation sites from the β_2 -adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature* 333, 370-373.
36. Braun,B.C., Glickman,M., Kraft,R., Dahlmann,B., Kloetzel,P.M., Finley,D., and Schmidt,M. (1999). The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat.Cell Biol.* 1, 221-226.
37. Brodsky,J.L. (1996). Post-translational protein translocation: not all hsc70s are created equal. *Trends Biochem.Sci.* 21, 122-126.
38. Brown,C.R., Hong-Brown,L.Q., Biwersi,J., Verkman,A.S., and Welch,W.J. (1996). Chemical chaperones correct the mutant phenotype of the delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein. *Cell Stress.Chaperones.* 1, 117-125.
39. Bu,G. (2001). The roles of receptor-associated protein (RAP) as a molecular chaperone for members of the LDL receptor family. *Int.Rev.Cytol.* 209, 79-116.

40. Buchner,J. (1999). Hsp90 & Co. - a holding for folding. *Trends Biochem.Sci.* *24*, 136-141.
41. Butz,J.A., Niebauer,R.T., and Robinson,A.S. (2003). Co-expression of molecular chaperones does not improve the heterologous expression of mammalian G-protein coupled receptor expression in yeast. *Biotechnol.Bioeng.* *84*, 292-304.
42. Caramelo,J.J., Castro,O.A., Alonso,L.G., Prat-Gay,G., and Parodi,A.J. (2003). UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase recognizes structured and solvent accessible hydrophobic patches in molten globule-like folding intermediates. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *100*, 86-91.
43. Chapple,J.P. and Cheetham,M.E. (2003). The chaperone environment at the cytoplasmic face of the endoplasmic reticulum can modulate rhodopsin processing and inclusion formation. *J.Biol.Chem.* *278*, 19087-19094.
44. Chini,B., Mouillac,B., Ala,Y., Balestre,M.N., Trump-Kallmeyer,S., Hoflack,J., Elands,J., Hibert,M., Manning,M., Jard,S., and Barberis,C. (1995). Tyr 115 is the key residue for determining agonist selectivity in the V1a vasopressin receptor. *EMBO J.* *14*, 2176-2182.
45. Chowdrey,H.S. and Lightman,S.L. (1993). Role of central amino acids and peptide-mediated pathways in neurohypophysial hormone release. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* *689*, 183-193.

46. Christensen,B.M., Zelenina,M., Aperia,A., and Nielsen,S. (2000). Localization and regulation of PKA-phosphorylated AQP2 in response to V(2)-receptor agonist/antagonist treatment. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 278, F29-F42.
47. Claing,A., Laporte,S.A., Caron,M.G., and Lefkowitz,R.J. (2002). Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog.Neurobiol.* 66, 61-79.
48. Claing,A., Perry,S.J., Achiriloaie,M., Walker,J.K., Albanesi,J.P., Lefkowitz,R.J., and Premont,R.T. (2000). Multiple endocytic pathways of G protein-coupled receptors delineated by GIT1 sensitivity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 1119-1124.
49. Conesa,A., Jeenes,D., Archer,D.B., van den Hondel,C.A., and Punt,P.J. (2002). Calnexin overexpression increases manganese peroxidase production in *Aspergillus niger*. *Appl.Environ.Microbiol.* 68, 846-851.
50. Coux,O., Tanaka,K., and Goldberg,A.L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu.Rev.Biochem.* 65, 801-847.
51. Crespo,P., Xu,N., Simonds,W.F., and Gutkind,J.S. (1994). Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 369, 418-420.
52. Daaka,Y., Luttrell,L.M., and Lefkowitz,R.J. (1997). Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* 390, 88-91.

53. Dai,R.M. and Li,C.C. (2001). Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation. *Nat.Cell Biol.* 3, 740-744.
54. Danilczyk,U.G., Cohen-Doyle,M.F., and Williams,D.B. (2000). Functional relationship between calreticulin, calnexin, and the endoplasmic reticulum luminal domain of calnexin. *J.Biol.Chem.* 275 , 13089-13097.
55. Danilczyk,U.G. and Williams,D.B. (2001). The lectin chaperone calnexin utilizes polypeptide-based interactions to associate with many of its substrates in vivo. *J.Biol.Chem.* 276, 25532-25540.
56. de Groot,B.L. and Grubmuller,H. (2001). Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. *Science* 294, 2353-2357.
57. Decaux,G. (2001). Long-term treatment of patients with inappropriate secretion of antidiuretic hormone by the vasopressin receptor antagonist conivaptan, urea, or furosemide. *Am.J Med.* 110, 582-584.
58. Deen,P.M., Croes,H., van Aubel,R.A., Ginsel,L.A., and van Os,C.H. (1995). Water channels encoded by mutant aquaporin-2 genes in nephrogenic diabetes insipidus are impaired in their cellular routing. *J.Clin.Invest* 95, 2291-2296.
59. Deen,P.M.T., Verdijk,M.A.J., Knoers,N.V.A.M., Wieringa,B., Monnens,L.A.H., van Os,C.H., and van Oost,B.A. (1994). Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine. *Science* 264, 92-95.

60. Defea,K.A., Vaughn,Z.D., O'Bryan,E.M., Nishijima,D., Dery,O., and Bunnett,N.W. (2000a). The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta -arrestin-dependent scaffolding complex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 11086-11091.
61. Defea,K.A., Zalevsky,J., Thoma,M.S., Dery,O., Mullins,R.D., and Bunnett,N.W. (2000b). beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J Cell Biol.* 148, 1267-1281.
62. DeMartino,G.N. and Slaughter,C.A. (1999). The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *J.Biol.Chem.* 274, 22123-22126.
63. Deneka,M., Neeft,M., and van der,S.P. (2003). Regulation of membrane transport by rab GTPases. *Crit Rev.Biochem.Mol.Biol.* 38, 121-142.
64. Denker,B.M., Smith,B.L., Kuhajda,F.P., and Agre,P. (1988). Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. *J.Biol.Chem.* 263, 15634-15642.
65. Denning,G.M., Anderson,M.P., Amara,J.F., Marshall,J., Smith,A.E., and Welsh,M.J. (1992). Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive [see comments]. *Nature* 358, 761-764.
66. Deveraux,Q., Ustrell,V., Pickart,C., and Rechsteiner,M. (1994). A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J.Biol.Chem.* 269, 7059-7061.
67. Devi,L.A. (2000). G-protein-coupled receptor dimers in the lime light. *Trends Pharmacol.Sci.* 21, 324-326.

68. DiGiovanni,S.R., Nielsen,S., Christensen,E.I., and Knepper,M.A. (1994). Regulation of collecting duct water channel expression by vasopressin in Brattleboro rat. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91, 8984-8988.
69. Dreifuss,J.J. (1975). A review on neurosecretory granules: their contents and mechanisms of release. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 248, 184-201.
70. Elkabetz,Y., Shapira,I., Rabinovich,E., and Bar-Nun,S. (2004). Distinct steps in dislocation of luminal endoplasmic reticulum-associated degradation substrates: roles of endoplasmic reticulum-bound p97/Cdc48p and proteasome. *J.Biol.Chem.* 279, 3980-3989.
71. Ellgaard,L. and Helenius,A. (2001). ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Curr.Opin.Cell Biol.* 13, 431-437.
72. Ellgaard,L. and Helenius,A. (2003). Quality control system in the endoplasmic reticulum. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 4, 181-191.
73. Ellgaard,L., Molinari,M., and Helenius,A. (1999). Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* 286, 1882-1888.
74. Ernst,O.P., Meyer,C.K., Marin,E.P., Henklein,P., Fu,W.Y., Sakmar,T.P., and Hofmann,K.P. (2000). Mutation of the fourth cytoplasmic loop of rhodopsin affects binding of transducin and peptides derived from the carboxyl-terminal sequences of transducin alpha and gamma subunits. *J.Biol.Chem.* 275, 1937-1943.
75. Fabunmi,R.P., Wigley,W.C., Thomas,P.J., and DeMartino,G.N. (2000). Activity and regulation of the centrosome-associated proteasome. *J.Biol.Chem.* 275, 409-413.

76. Ferguson,S.S., Menard,L., Barak,L.S., Koch,W.J., Colapietro,A.M., and Caron,M.G. (1995). Role of phosphorylation in agonist-promoted beta 2-adrenergic receptor sequestration. Rescue of a sequestration-defective mutant receptor by beta ARK1. *J.Biol.Chem.* 270, 24782-24789.
77. Flynn,G.C., Chappell,T.G., and Rothman,J.E. (1989). Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. *Science* 245, 385-390.
78. Flynn,G.C., Pohl,J., Flocco,M.T., and Rothman,J.E. (1991). Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Nature* 353, 726-730.
79. Fotiadis,D., Liang,Y., Filipek,S., Saperstein,D.A., Engel,A., and Palczewski,K. (2003). Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes. *Nature* 421, 127-128.
80. Fourie,A.M., Sambrook,J.F., and Gething,M.J. (1994). Common and divergent peptide binding specificities of hsp70 molecular chaperones. *J.Biol.Chem.* 269, 30470-30478.
81. Franke,R.R., König,B., Sakmar,T.P., Khorana,H.G., and Hofmann,K.P. (1990). Rhodopsin mutants that bind but fail to activate transducin. *Science* 250, 123-125.
82. Fushimi,K., Uchida,S., Hara,Y., Hirata,Y., Marumo,F., and Sasaki,S. (1993). Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. *Nature* 361, 549.
83. Gazit,E. (2002). The "correctly folded" state of proteins : Is it a metastable state? *Angew.Chem.Int.Ed.* 41, 257-259.

84. Gether,U., Ballesteros,J.A., Seifert,R., Sanders-Bush,E., Weinstein,H., and Kobilka,B.K. (1997a). Structural instability of a constitutively active G protein-coupled receptor. Agonist-independent activation due to conformational flexibility. *J Biol.Chem.* 272, 2587-2590.
85. Gether,U., Lin,S., Ghanouni,P., Ballesteros,J.A., Weinstein,H., and Kobilka,B.K. (1997b). Agonists induce conformational changes in transmembrane domains III and VI of the beta2 adrenoceptor. *EMBO J.* 16, 6737-6747.
86. Gething,M.J. (1999). Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin.Cell Dev.Biol.* 10, 465-472.
87. Gething,M.J. and Sambrook,J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature* 355, 33-45.
88. Gilbert,T.L., Bennett,T.A., Maestas,D.C., Cimino,D.F., and Prossnitz,E.R. (2001). Internalization of the human N-formyl peptide and C5a chemoattractant receptors occurs via clathrin-independent mechanisms. *Biochemistry* 40, 3467-3475.
89. Gonz,l.R., Andrews,B.A., and Asenjo,J.A. (2002). Kinetic model of BiP- and PDI-mediated protein folding and assembly. *J.Theor.Biol.* 214, 529-537.
90. Goodman,O.B., Krupnick,J.G., Santini,F., Gurevich,V.V., Penn,R.B., Gagnon,A.B., Keen,J.H., and Benovic,J.L. (1996). Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the bea2-adrenergic receptor. *Nature* 383, 447-450.
91. Goodman,O.B., Jr., Krupnick,J.G., Gurevich,V.V., Benovic,J.L., and Keen,J.H. (1997). Arrestin/clathrin interaction. Localization of the arrestin binding locus to the clathrin terminal domain. *J.Biol.Chem.* 272, 15017-15022.

92. Gorelick,F.S. and Shugrue,C. (2001). Exiting the endoplasmic reticulum. *Mol.Cell Endocrinol.* 177, 13-18.
93. Granzin,J., Wilden,U., Choe,H.W., Labahn,J., Krafft,B., and Buldt,G. (1998). X-ray crystal structure of arrestin from bovine rod outer segments. *Nature* 391, 918-921.
94. Gurevich,V.V., Dion,S.B., Onorato,J.J., Ptasienski,J., Kim,C.M., Sterne-Marr,R., Hosey,M.M., and Benovic,J.L. (1995). Arrestin interactions with G protein-coupled receptors. Direct binding studies of wild type and mutant arrestins with rhodopsin, beta 2-adrenergic, and m2 muscarinic cholinergic receptors. *J.Biol.Chem.* 270, 720-731.
95. Gurevich,V.V. and Gurevich,E.V. (2004). The molecular acrobatics of arrestin activation. *Trends Pharmacol.Sci.* 25, 105-111.
96. Gutkind,J.S. (1998). The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J.Biol.Chem.* 273, 1839-1842.
97. Hamm,H.E. (2001). How activated receptors couple to G proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 4819-4821.
98. Hamman,B.D., Hendershot,L.M., and Johnson,A.E. (1998). BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. *CELL* 92, 747-758.

99. Hammond,C., Braakman,I., and Helenius,A. (1994). Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 91, 913-917.
100. Hammond,C. and Helenius,A. (1994). Folding of VSV G protein: sequential interaction with BiP and calnexin. *Science* 266, 456-458.
101. Hartl,F.U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381, 571-579.
102. Hausdorff,W.P., Bouvier,M., O'Dowd,B.F., Irons,G.P., Caron,M.G., and Lefkowitz,R.J. (1989). Phosphorylation sites on two domains of the β_2 -adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J.Biol.Chem.* 264, 12657-12665.
103. Hebert,S.C. (1998). Roles of Na-K-2Cl and Na-Cl cotransporters and ROMK potassium channels in urinary concentrating mechanism. *Am.J.Physiol* 275, F325-F327.
104. Heinflink,M., Nussenzweig,D.R., Grimberg,H., Lupu-Meiri,M., Oron,Y., and Gershengorn,M.C. (1995). A constitutively active mutant thyrotropin-releasing hormone receptor is chronically down-regulated in pituitary cells: evidence using chlordiazepoxide as a negative antagonist. *Mol.Endocrinol.* 9, 1455-1460.
105. Helenius,A. and Aebi,M. (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291, 2364-2369.

106. Helenius,A., Trombetta E.S., Hebert D, and Simons J.F. Calnexin, calreticulin and the folding of glycoproteins. *Trends Cell Biol.* 7[5], 193-200. 1997. 1997.
Ref Type: Journal (Full)
107. Hendershot,L., Wei,J., Gaut,J., Melnick,J., Aviel,S., and Argon,Y. (1996). Inhibition of immunoglobulin folding and secretion by dominant negative BiP ATPase mutants. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 5269-5274.
108. Hermosilla,R. and Schulein,R. (2001). Sorting functions of the individual cytoplasmic domains of the G protein-coupled vasopressin V(2) receptor in Madin Darby canine kidney epithelial cells. *Mol.Pharmacol.* 60, 1031-1039.
109. Herrlich,A., Daub,H., Knebel,A., Herrlich,P., Ullrich,A., Schultz,G., and Gudermann,T. (1998). Ligand-independent activation of platelet-derived growth factor receptor is a necessary intermediate in lysophosphatidic, acid-stimulated mitogenic activity in L cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 8985-8990.
110. Hershko,A. and Ciechanover,A. (1998). The ubiquitin system. *Annu.Rev.Biochem.* 67, 425-479.
111. Heydorn,A., Sondergaard,B.P., Ersboll,B., Holst,B., Nielsen,F.C., Haft,C.R., Whistler,J., and Schwartz,T.W. (2004). A library of 7TM receptor C-terminal tails - interactions with the proposed post-endocytic sorting proteins EBP50, NSF, SNX1 and GASP. *J Biol.Chem.*
112. Hicke,L. (2001a). A new ticket for entry into budding vesicles-ubiquitin. *CELL* 106, 527-530.

113. Hicke,L. (2001b). Protein regulation by monoubiquitin. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2, 195-201.
114. Hochstrasser,M. (1996). Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu.Rev.Genet.* 30, 405-439.
115. Holtzman,E.J., Kolakowski,L.F., Jr., O'Brien,D., Crawford,J.D., and Ausiello,D.A. (1993). A Null mutation in the vasopressin V2 receptor gene (AVPR2) associated with nephrogenic diabetes insipidus in the Hopewell kindred. *Hum.Mol.Genet.* 2, 1201-1204.
116. Hosokawa,N., Wada,I., Hasegawa,K., Yorihuzi,T., Tremblay,L.O., Herscovics,A., and Nagata,K. (2001). A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation. *EMBO Rep.* 2, 415-422.
117. Hozawa,S., Holtzman,E.J., and Ausiello,D.A. (1996). cAMP motifs regulating transcription in the aquaporin 2 gene. *Am.J.Physiol* 270, C1695-C1702.
118. Iodice,L., Sarnataro,S., and Bonatti,S. (2001). The carboxyl-terminal valine is required for transport of glycoprotein CD8 alpha from the endoplasmic reticulum to the intermediate compartment. *J.Biol.Chem.* 276, 28920-28926.
119. Ito,M., Oiso,Y., Murase,T., Kondo,K., Saito,H., Chinzei,T., Racchi,M., and Lively,M.O. (1993). Possible involvement of inefficient cleavage of preprovasopressin by signal peptidase as a cause for familial central diabetes insipidus. *J.Clin.Invest* 91, 2565-2571.

120. Jackson,M.R., Cohen-Doyle,M.F., Peterson,P.A., and Williams,D.B. (1994). Regulation of MHC class I transport by the molecular chaperone, calnexin (p88, IP90). *Science* 263, 384-387.
121. Jakob,C.A., Bodmer,D., Spirig,U., Battig,P., Marcil,A., Dignard,D., Bergeron,J.J., Thomas,D.Y., and Aebl,M. (2001). Htm1p, a mannosidase-like protein, is involved in glycoprotein degradation in yeast. *EMBO Rep.* 2, 423-430.
122. Jakob,C.A., Burda,P., Roth,J., and Aebl,M. (1998). Degradation of misfolded endoplasmic reticulum glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by a specific oligosaccharide structure. *J.Cell Biol.* 142, 1223-1233.
123. Jakobsson,B. and Berg,U. (1994). Effect of hydrochlorothiazide and indomethacin treatment on renal function in nephrogenic diabetes insipidus. *Acta Paediatr.* 83, 522-525.
124. Jan,L.Y. and Jan,Y.N. (1997). Receptor-regulated ion channels. *Curr.Opin.Cell Biol.* 9, 155-160.
125. Johnson,A.E. and van Waes,M.A. (1999). The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 15, 799-842.
126. Jung,J.S., Preston,G.M., Smith,B.L., Guggino,W.B., and Agre,P. (1994). Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. *J.Biol.Chem.* 269, 14648-14654.

127. Kamhi-Nesher,S., Shenkman,M., Tolchinsky,S., Fromm,S.V., Ehrlich,R., and Lederkremer,G.Z. (2001). A novel quality control compartment derived from the endoplasmic reticulum. *Mol.Biol.Cell* 12, 1711-1723.
128. Katzmann,D.J., Babst,M., and Emr,S.D. (2001). Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *CELL* 106, 145-155.
129. Kenakin,T. (1996). The classification of seven transmembrane receptors in recombinant expression systems. *Pharmacol.Rev.* 48, 413-463.
130. Kere,J. (1999). Kidney kinetics and chloride ion pumps. *Nat.Genet.* 21, 67-68.
131. Kim,Y.M., Barak,L.S., Caron,M.G., and Benovic,J.L. (2002). Regulation of arrestin-3 phosphorylation by casein kinase II. *J Biol.Chem.* 277, 16837-16846.
132. Kisselev,O.G., Ermolaeva,M.V., and Gautam,N. (1994). A farnesylated domain in the G protein gamma subunit is a specific determinant of receptor coupling. *J.Biol.Chem.* 269, 21399-21402.
133. Knarr,G., Gething,M.J., Modrow,S., and Buchner,J. (1995). BiP binding sequences in antibodies. *J.Biol.Chem.* 270, 27589-27594.
134. Knepper,M.A. (1997). Molecular physiology of urinary concentrating mechanism: regulation of aquaporin water channels by vasopressin. *Am.J.Physiol* 272, F3-12.

135. Kohler,A., Cascio,P., Leggett,D.S., Woo,K.M., Goldberg,A.L., and Finley,D. (2001). The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol.Cell* 7, 1143-1152.
136. Kopito,R.R. and Ron,D. (2000). Conformational disease. *Nat.Cell Biol.* 2, E207-E209.
137. Kornfeld,R. and Kornfeld,S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu.Rev.Biochem.* 54, 631-664.
138. Kozasa,T. (2004). The structure of GRK2-G beta gamma complex: intimate association of G-protein signaling modules. *Trends Pharmacol.Sci.* 25, 61-63.
139. Krause,G., Hermosilla,R., Oksche,A., Rutz,C., Rosenthal,W., and Schulein,R. (2000). Molecular and conformational features of a transport-relevant domain in the C-terminal tail of the vasopressin V(2) receptor. *Mol.Pharmacol.* 57, 232-242.
140. Krueger,K.M., Daaka,Y., Pitcher,J.A., and Lefkowitz,R.J. (1997). The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. *J.Biol.Chem.* 272, 5-8.
141. Krupnick,J.G. and Benovic,J.L. (1998). The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. [Review] [200 refs]. *Annual Review of Pharmacology & Toxicology* 38, 289-319.
142. Krupnick,J.G., Goodman,O.B., Jr., Keen,J.H., and Benovic,J.L. (1997a). Arrestin/clathrin interaction. Localization of the clathrin binding domain of nonvisual arrestins to the carboxy terminus. *J.Biol.Chem.* 272, 15011-15016.

143. Krupnick,J.G., Santini,F., Gagnon,A.W., Keen,J.H., and Benovic,J.L. (1997b). Modulation of the arrestin-clathrin interaction in cells. Characterization of beta-arrestin dominant-negative mutants. *J.Biol.Chem.* 272, 32507-32512.
144. Lal,A., Pang,P., Kalelkar,S., Romero,P.A., Herscovics,A., and Moremen,K.W. (1998). Substrate specificities of recombinant murine Golgi alpha1, 2-mannosidases IA and IB and comparison with endoplasmic reticulum and Golgi processing alpha1,2-mannosidases. *Glycobiology* 8, 981-995.
145. Lam,Y.A., Lawson,T.G., Velayutham,M., Zweier,J.L., and Pickart,C.M. (2002). A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature* 416, 763-767.
146. Lamb,M.E., de Weerd,W.F., and Leeb-Lundberg,L.M. (2001). Agonist-promoted trafficking of human bradykinin receptors: arrestin- and dynamin-independent sequestration of the B2 receptor and bradykinin in HEK293 cells. *Biochem.J* 355, 741-750.
147. Laporte,S., Oakley,R., Zhang,J., Holt,J., Ferguson,S.S., Caron,M.G., and Barak,L.S. (1999). The beta-2 adrenergic receptor/beta-arrestin complex recruits the clathrin adaptor AP2 during endocytosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 96, in press.
148. Laporte,S.A., Oakley,R.H., Holt,J.A., Barak,L.S., and Caron,M.G. (2000). The interaction of beta-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *J.Biol.Chem.* 275, 23120-23126.

149. Laursen,U.H., Pihakaski-Maunsbach,K., Kwon,T.H., Ostergaard,J.E., Nielsen,S., and Maunsbach,A.B. (2004). Changes of rat kidney AQP2 and Na,K-ATPase mRNA expression in lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus. *Nephron Exp.Nephrol.* 97, e1-16.
150. Leach,M.R., Cohen-Doyle,M.F., Thomas,D.Y., and Williams,D.B. (2002). Localization of the lectin, ERp57 binding, and polypeptide binding sites of calnexin and calreticulin. *J.Biol.Chem.* 277, 29686-29697.
151. Leclerc,P.C., Auger-Messier,M., Lanctot,P.M., Escher,E., Leduc,R., and Guillemette,G. (2002). A polyaromatic caveolin-binding-like motif in the cytoplasmic tail of the type 1 receptor for angiotensin II plays an important role in receptor trafficking and signaling. *Endocrinology* 143, 4702-4710.
152. Lee,C., Schwartz,M.P., Prakash,S., Iwakura,M., and Matouschek,A. (2001). ATP-dependent proteases degrade their substrates by processively unraveling them from the degradation signal. *Mol.Cell* 7, 627-637.
153. Lee,R.J., Liu,C.W., Harty,C., McCracken,A.A., Latterich,M., Romisch,K., DeMartino,G.N., Thomas,P.J., and Brodsky,J.L. (2004). Uncoupling retro-translocation and degradation in the ER-associated degradation of a soluble protein. *EMBO J.* 23, 2206-2215.
154. Lee,T.W., Cotecchia,S., and Milligan,G. (1997). Up-regulation of the levels of expression and function of a constitutively active mutant of the hamster $\alpha 1B$ -adrenoceptor by ligands that act as inverse agonists. *Biochem.J* 325 (Pt 3), 733-739.

155. Leff,P. (1995). The two-state model of receptor activation. *Trends Pharmacol.Sci.* *16*, 89-97.
156. Lefkowitz,R.J. (1993). G protein-coupled receptor kinases. *CELL* *74*, 409-412.
157. Lefkowitz,R.J., Cotecchia,S., Samama,P., and Costa,T. (1993). Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends Pharmacol.Sci.* *14*, 303-307.
158. Letourneur,F., Gaynor,E.C., Hennecke,S., Demolliere,C., Duden,R., Emr,S.D., Riezman,H., and Cosson,P. (1994). Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *CELL* *79*, 1199-1207.
159. Leuthauser,K., Gujer,R., Aldecoa,A., McKinney,R.A., Muff,R., Fischer,J.A., and Born,W. (2000). Receptor-activity-modifying protein 1 forms heterodimers with two G- protein-coupled receptors to define ligand recognition. *Biochem.J.* *351 Pt 2*, 347-351.
160. Lin,F.T., Chen,W., Shenoy,S., Cong,M., Exum,S.T., and Lefkowitz,R.J. (2002). Phosphorylation of beta-arrestin2 regulates its function in internalization of beta(2)-adrenergic receptors. *Biochemistry* *41*, 10692-10699.
161. Lin,F.T., Krueger,K.M., Kendall,H.E., Daaka,Y., Fredericks,Z.L., Pitcher,J.A., and Lefkowitz,R.J. (1997). Clathrin-mediated endocytosis of the beta-adrenergic receptor is regulated by phosphorylation/dephosphorylation of beta-arrestin1. *J Biol.Chem.* *272*, 31051-31057.

162. Lin,F.T., Miller,W.E., Luttrell,L.M., and Lefkowitz,R.J. (1999). Feedback regulation of beta-arrestin1 function by extracellular signal-regulated kinases. *J Biol.Chem.* 274, 15971-15974.
163. Liu,C.W., Millen,L., Roman,T.B., Xiong,H., Gilbert,H.F., Noiva,R., DeMartino,G.N., and Thomas,P.J. (2002). Conformational remodeling of proteasomal substrates by PA700, the 19 S regulatory complex of the 26 S proteasome. *J.Biol.Chem.* 277, 26815-26820.
164. Lohse,M.J., Benovic,J.L., Codina,J., Caron,M.G., and Lefkowitz,R.J. (1990). beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* 248, 1547-1550.
165. Lomax,R.B., Camello,C., Van Coppenolle,F., Petersen,O.H., and Tepikin,A.V. (2002). Basal and physiological Ca(2+) leak from the endoplasmic reticulum of pancreatic acinar cells. Second messenger-activated channels and translocons. *J.Biol.Chem.* 277, 26479-26485.
166. Loo,T.W. and Clarke,D.M. (1995). P-glycoprotein. Associations between domains and between domains and molecular chaperones. *J.Biol.Chem.* 270, 21839-21844.
167. Lopez-Illasaca,M., Crespo,P., Pellici,P.G., Gutkind,J.S., and Wetzker,R. (1997). Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma. *Science* 275, 394-397.

168. Lu,H., Sun,T.X., Bouley,R., Blackburn,K., McLaughlin,M., and Brown,D. (2004). Inhibition of endocytosis causes phosphorylation (S256)-independent plasma membrane accumulation of AQP2. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 286, F233-F243.
169. Lukacs,G.L., Chang,X.B., Bear,C., Kartner,N., Mohamed,A., Riordan,J.R., and Grinstein,S. (1993). The delta F508 mutation decreases the stability of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the plasma membrane. Determination of functional half-lives on transfected cells. *J Biol.Chem.* 268, 21592-21598.
170. Luttrell,L.M., Daaka,Y., and Lefkowitz,R.J. (1999). Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. *Curr.Opin.Cell Biol.* 11, 177-183.
171. Luttrell,L.M., Della,R.G., van Biesen,T., Luttrell,D.K., and Lefkowitz,R.J. (1997). Gbetagamma subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation. *J.Biol.Chem.* 272, 4637-4644.
172. Luttrell,L.M. and Lefkowitz,R.J. (2002). The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci.* 115, 455-465.
173. Luttrell,L.M., Roudabush,F.L., Choy,E.W., Miller,W.E., Field,M.E., Pierce,K.L., and Lefkowitz,R.J. (2001). Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 2449-2454.
174. Lyman,S.K. and Schekman,R. (1997). Binding of secretory precursor polypeptides to a translocon subcomplex is regulated by BiP. *CELL* 88, 85-96.

175. Ma,D., Zerangue,N., Lin,Y.F., Collins,A., Yu,M., Jan,Y.N., and Jan,L.Y. (2001). Role of ER export signals in controlling surface potassium channel numbers. *Science* 291, 316-319.
176. Ma,D., Zerangue,N., Raab-Graham,K., Fried,S.R., Jan,Y.N., and Jan,L.Y. (2002). Diverse trafficking patterns due to multiple traffic motifs in G protein-activated inwardly rectifying potassium channels from brain and heart. *NEURON* 33, 715-729.
177. Ma,T., Song,Y., Yang,B., Gillespie,A., Carlson,E.J., Epstein,C.J., and Verkman,A.S. (2000). Nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking aquaporin-3 water channels. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 4386-4391.
178. Ma,T., Yang,B., Gillespie,A., Carlson,E.J., Epstein,C.J., and Verkman,A.S. (1997). Generation and phenotype of a transgenic knockout mouse lacking the mercurial-insensitive water channel aquaporin-4. *J.Clin.Invest* 100, 957-962.
179. Ma,T., Yang,B., Gillespie,A., Carlson,E.J., Epstein,C.J., and Verkman,A.S. (1998). Severely impaired urinary concentrating ability in transgenic mice lacking aquaporin-1 water channels. *J.Biol.Chem.* 273, 4296-4299.
180. Marchese,A. and Benovic,J.L. (2001). Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting. *J Biol.Chem.* 276, 45509-45512.

181. Marin,E.P., Krishna,A.G., Zvyaga,T.A., Isele,J., Siebert,F., and Sakmar,T.P. (2000). The amino terminus of the fourth cytoplasmic loop of rhodopsin modulates rhodopsin-transducin interaction. *J.Biol.Chem.* 275, 1930-1936.
182. Marinissen,M.J. and Gutkind,J.S. (2001). G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol.Sci.* 22, 368-376.
183. Martin,N.P., Lefkowitz,R.J., and Shenoy,S.K. (2003). Regulation of V2 vasopressin receptor degradation by agonist promoted Ubiquitination. *J Biol.Chem.*
184. Martinez-Castelao,A. (2002). Conivaptan (Yamanouchi). *Curr.Opin.Investig.Drugs* 3, 89-95.
185. Matsuoka,K., Morimitsu,Y., Uchida,K., and Schekman,R. (1998). Coat assembly directs v-SNARE concentration into synthetic COPII vesicles. *Mol.Cell* 2, 703-708.
186. Maudsley,S., Pierce,K.L., Zamah,A.M., Miller,W.E., Ahn,S., Daaka,Y., Lefkowitz,R.J., and Luttrell,L.M. (2000). The beta(2)-adrenergic receptor mediates extracellular signal-regulated kinase activation via assembly of a multi-receptor complex with the epidermal growth factor receptor. *J Biol.Chem.* 275, 9572-9580.
187. Mayer,M., Kies,U., Kammermeier,R., and Buchner,J. (2000). BiP and PDI cooperate in the oxidative folding of antibodies in vitro. *J.Biol.Chem.* 275, 29421-29425.
188. Mayer,T.U., Braun,T., and Jentsch,S. (1998). Role of the proteasome in membrane extraction of a short-lived ER-transmembrane protein. *EMBO J.* 17, 3251-3257.

189. McDonald,P.H., Chow,C.W., Miller,W.E., Laporte,S.A., Field,M.E., Lin,F.T., Davis,R.J., and Lefkowitz,R.J. (2000). Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science* 290, 1574-1577.
190. McKay,D.B. (1993). Structure and mechanism of 70-kDa heat-shock-related proteins. *Adv.Protein Chem.* 44, 67-98.
191. McLatchie,L.M., Fraser,N.J., Main,M.J., Wise,A., Brown,J., Thompson,N., Solari,R., Lee,M.G., and Foord,S.M. (1998). RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 393, 333-339.
192. McMahon,H.T., Wigge,P., and Smith,C. (1997). Clathrin interacts specifically with amphiphysin and is displaced by dynamin. *FEBS Lett.* 413, 319-322.
193. Melnick,J., Dul,J.L., and Argon,Y. (1994). Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum. *Nature* 370, 373-375.
194. Meunier,L., Usherwood,Y.K., Chung,K.T., and Hendershot,L.M. (2002). A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. *Mol.Biol.Cell* 13, 4456-4469.
195. Mizrachi,D. and Segaloff,D.L. (2004). Intracellularly located misfolded glycoprotein hormone receptors associate with different chaperone proteins than their cognate wild-type receptors. *Mol.Endocrinol.* 18, 1768-1777.

196. Molinari,M., Galli,C., Piccaluga,V., Pieren,M., and Paganetti,P. (2002). Sequential assistance of molecular chaperones and transient formation of covalent complexes during protein degradation from the ER. *J.Cell Biol.* *158*, 247-257.
197. Molinari,M. and Helenius,A. (2000). Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum. *Science* *288*, 331-333.
198. Morello,J.P. and Bichet,D.G. (2001). Nephrogenic diabetes insipidus. *Annu.Rev.Physiol* *63*, 607-630.
199. Morello,J.P., Salahpour,A., Laperriere,A., Bernier,V., Arthus,M.F., Lonergan,M., Petaja-Repo,U., Angers,S., Morin,D., Bichet,D.G., and Bouvier,M. (2000). Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants. *J.Clin.Invest* *105*, 887-895.
200. Mouillac,B., Chini,B., Balestre,M.N., Elands,J., Trump-Kallmeyer,S., Hoflack,J., Hibert,M., Jard,S., and Barberis,C. (1995). The binding site of neuropeptide vasopressin Via receptor. *J.Biol.Chem.* *270*, 25771-25777.
201. Mulders,S.M., Knoers,N.V., Van Lieburg,A.F., Monnens,L.A., Leumann,E., Wuhl,E., Schober,E., Rijss,J.P., van Os,C.H., and Deen,P.M. (1997). New mutations in the AQP2 gene in nephrogenic diabetes insipidus resulting in functional but misrouted water channels. *Journal of the American Society of Nephrology* *8*, 242-248.
202. Mundell,S.J. and Benovic,J.L. (2000). Selective regulation of endogenous G protein-coupled receptors by arrestins in HEK293 cells. *J Biol.Chem.* *275*, 12900-12908.

203. Nehls,S., Snapp,E.L., Cole,N.B., Zaal,K.J., Kenworthy,A.K., Roberts,T.H., Ellenberg,J., Presley,J.F., Siggia,E., and Lippincott-Schwartz,J. (2000). Dynamics and retention of misfolded proteins in native ER membranes. *Nat.Cell Biol.* 2, 288-295.
204. Neves,S.R., Ram,P.T., and Iyengar,R. (2002). G protein pathways. *Science* 296, 1636-1639.
205. Nichols,W.C., Seligsohn,U., Zivelin,A., Terry,V.H., Hertel,C.E., Wheatley,M.A., Moussalli,M.J., Hauri,H.P., Ciavarella,N., Kaufman,R.J., and Ginsburg,D. (1998). Mutations in the ER-Golgi intermediate compartment protein ERGIC-53 cause combined deficiency of coagulation factors V and VIII. *CELL* 93, 61-70.
206. Nielsen,S., Chou,C.L., Marples,D., Christensen,E.I., Kishore,B.K., and Knepper,M.A. (1995). Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 92, 1013-1017.
207. Nielsen,S., DiGiovanni,S.R., Christensen,E.I., Knepper,M.A., and Harris,H.W. (1993a). Cellular and subcellular immunolocalization of vasopressin-regulated water channel in rat kidney. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90, 11663-11667.
208. Nielsen,S., Kwon,T.H., Christensen,B.M., Promeneur,D., Frokiaer,J., and Marples,D. (1999). Physiology and pathophysiology of renal aquaporins. *J.Am.Soc.Nephrol.* 10, 647-663.

209. Nielsen,S., Smith,B.L., Christensen,E.I., Knepper,M.A., and Agre,P. (1993b). CHIP28 water channels are localized in constitutively water- permeable segments of the nephron. *J.Cell Biol.* 120 , 371-383.
210. Nishimoto,G., Zelenina,M., Li,D., Yasui,M., Aperia,A., Nielsen,S., and Nairn,A.C. (1999). Arginine vasopressin stimulates phosphorylation of aquaporin-2 in rat renal tissue. *Am.J.Physiol* 276, F254-F259.
211. Nishimura,N. and Balch,W.E. (1997). A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum. *Science* 277, 556-558.
212. Noda,Y. and Sasaki,S. (2004). Molecular mechanisms and drug development in aquaporin water channel diseases: molecular mechanism of water channel aquaporin-2 trafficking. *J Pharmacol.Sci.* 96, 249-254.
213. Nufer,O., Guldbrandsen,S., Degen,M., Kappeler,F., Paccaud,J.P., Tani,K., and Hauri,H.P. (2002). Role of cytoplasmic C-terminal amino acids of membrane proteins in ER export. *J.Cell Sci.* 115 , 619-628.
214. Oakley,R.H., Laporte,S.A., Holt,J.A., Barak,L.S., and Caron,M.G. (1999). Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J.Biol.Chem.* 274, 32248-32257.
215. Oakley,R.H., Laporte,S.A., Holt,J.A., Barak,L.S., and Caron,M.G. (2001). Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled

- receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis*. *J.Biol.Chem.* 276, 19452-19460.
216. Oakley,R.H., Laporte,S.A., Holt,J.A., Caron,M.G., and Barak,L.S. (2000). Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J.Biol.Chem.* 275, 17201-17210.
217. Okiyoneda,T., Harada,K., Takeya,M., Yamahira,K., Wada,I., Shuto,T., Suico,M.A., Hashimoto,Y., and Kai,H. (2004). Delta F508 CFTR pool in the endoplasmic reticulum is increased by calnexin overexpression. *Mol.Biol.Cell* 15, 563-574.
218. Oksche,A., Schulein,R., Rutz,C., Liebenhoff,U., Dickson,J., Muller,H., Birnbaumer,M., and Rosenthal,W. (1996). Vasopressin V2 receptor mutants that cause X-linked nephrogenic diabetes insipidus: analysis of expression, processing, and function. *Mol.Pharmacol.* 50, 820-828.
219. Oliver,J.D., Roderick,H.L., Llewellyn,D.H., and High,S. (1999). ERp57 functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins calreticulin and calnexin. *Mol.Biol.Cell* 10, 2573-2582.
220. Oliver,J.D., van der Wal,F.J., Bulleid,N.J., and High,S. (1997). Interaction of the thiol-dependent reductase ERp57 with nascent glycoproteins. *Science* 275, 86-88.
221. Orłowski,M. and Wilk,S. (2003). Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome. *Arch.Biochem.Biophys.* 415, 1-5.
222. PAGANELLI,C.V. and SOLOMON,A.K. (1957). The rate of exchange of tritiated water across the human red cell membrane. *J.Gen.Physiol* 41, 259-277.

223. Palczewski,K., Kumasaka,T., Hori,T., Behnke,C.A., Motoshima,H., Fox,B.A., Le,T., I, Teller,D.C., Okada,T., Stenkamp,R.E., Yamamoto,M., and Miyano,M. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289, 739-745.
224. Pals-Rylaarsdam,R., Gurevich,V.V., Lee,K.B., Ptasienski,J.A., Benovic,J.L., and Hosey,M.M. (1997). Internalization of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. Arrestin-independent and -dependent pathways. *J Biol.Chem.* 272, 23682-23689.
225. Pan,Y., Wilson,P., and Gitschier,J. (1994). The effect of eight V2 vasopressin receptor mutations on stimulation of adenylyl cyclase and binding to vasopressin. *J.Biol.Chem.* 269, 31933-31937.
226. Papp,S., Dziak,E., Michalak,M., and Opas,M. (2003). Is all of the endoplasmic reticulum created equal? The effects of the heterogeneous distribution of endoplasmic reticulum Ca²⁺-handling proteins. *J.Cell Biol.* 160, 475-479.
227. Parnot,C., Miserey-Lenkei,S., Bardin,S., Corvol,P., and Clauser,E. (2002). Lessons from constitutively active mutants of G protein-coupled receptors. *Trends Endocrinol.Metab* 13, 336-343.
228. Parodi,A.J. (1999). Reglucosylation of glycoproteins and quality control of glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum of yeast cells. *Biochim.Biophys.Acta* 1426, 287-295.
229. Parodi,A.J. (2000). Protein glucosylation and its role in protein folding. *Annu.Rev.Biochem.* 69, 69-93.

230. Peet,M. and Pratt,J.P. (1993). Lithium. Current status in psychiatric disorders. *Drugs* 46, 7-17.
231. Petaja-Repo,U.E., Hogue,M., Bhalla,S., Laperriere,A., Morello,J.P., and Bouvier,M. (2002). Ligands act as pharmacological chaperones and increase the efficiency of delta opioid receptor maturation. *EMBO J.* 21, 1628-1637.
232. Peters,J.M., Walsh,M.J., and Franke,W.W. (1990). An abundant and ubiquitous homo-oligomeric ring-shaped ATPase particle related to the putative vesicle fusion proteins Sec18p and NSF. *EMBO J.* 9, 1757-1767.
233. Pickart,C.M. (2001a). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu.Rev.Biochem.* 70, 503-533.
234. Pickart,C.M. (2001b). Ubiquitin enters the new millennium. *Mol.Cell* 8, 499-504.
235. Pierce,K.L., Luttrell,L.M., and Lefkowitz,R.J. (2001). New mechanisms in heptahelical receptor signaling to mitogen activated protein kinase cascades. *Oncogene* 20, 1532-1539.
236. Pitcher,J.A., Payne,E.S., Csontos,C., DePaoli-Roach,A.A., and Lefkowitz,R.J. (1995). The G-protein-coupled receptor phosphatase: a protein phosphatase type 2A with a distinct subcellular distribution and substrate specificity. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 92, 8343-8347.
237. Plemper,R.K., Egner,R., Kuchler,K., and Wolf,D.H. (1998). Endoplasmic reticulum degradation of a mutated ATP-binding cassette transporter Pdr5 proceeds in a concerted action of Sec61 and the proteasome. *J.Biol.Chem.* 273, 32848-32856.

238. Pollock,S., Kozlov,G., Pelletier,M.F., Trempe,J.F., Jansen,G., Sitnikov,D., Bergeron,J.J., Gehring,K., Ekiel,I., and Thomas,D.Y. (2004). Specific interaction of ERp57 and calnexin determined by NMR spectroscopy and an ER two-hybrid system. *EMBO J.* *23*, 1020-1029.
239. Postina,R., Ufer,E., Pfeiffer,R., Knoers,N.V., and Fahrenholz,F. (2000). Misfolded vasopressin V2 receptors caused by extracellular point mutations entail congenital nephrogenic diabetes insipidus. *Mol.Cell Endocrinol.* *164*, 31-39.
240. Premont,R.T., Inglese,J., and Lefkowitz,R.J. (1995). Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors. *FASEB J.* *9*, 175-182.
241. Prenzel,N., Zwick,E., Daub,H., Leserer,M., Abraham,R., Wallasch,C., and Ullrich,A. (1999). EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* *402*, 884-888.
242. Preston,G.M. and Agre,P. (1991). Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *88*, 11110-11114.
243. Preston,G.M., Carroll,T.P., Guggino,W.B., and Agre,P. (1992). Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* *256*, 385-387.
244. Probst,W.C., Snyder,L.A., Schuster,D.I., Brosius,J., and Sealfon,S.C. (1992). Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol.* *11*, 1-20.

245. Procino,G., Carmosino,M., Marin,O., Brunati,A.M., Contri,A., Pinna,L.A., Mannucci,R., Nielsen,S., Kwon,T.H., Svelto,M., and Valenti,G. (2003). Ser-256 phosphorylation dynamics of Aquaporin 2 during maturation from the ER to the vesicular compartment in renal cells. *FASEB J.* *17*, 1886-1888.
246. Ramjaun,A.R. and McPherson,P.S. (1998). Multiple amphipysin II splice variants display differential clathrin binding: identification of two distinct clathrin-binding sites. *J Neurochem.* *70* , 2369-2376.
247. Rapiejko,P.J. and Gilmore,R. (1997). Empty site forms of the SRP54 and SR alpha GTPases mediate targeting of ribosome-nascent chain complexes to the endoplasmic reticulum. *CELL* *89*, 703-713.
248. Reddy,P.S. and Corley,R.B. (1998). Assembly, sorting, and exit of oligomeric proteins from the endoplasmic reticulum. *Bioessays* *20*, 546-554.
249. Riddell,D.C., Mallonee,R., Phillips,J.A., Parks,J.S., Sexton,L.A., and Hamerton,J.L. (1985). Chromosomal assignment of human sequences encoding arginine vasopressin-neurophysin II and growth hormone releasing factor. *Somat.Cell Mol.Genet.* *11*, 189-195.
250. Rittig,S., Robertson,G.L., Siggaard,C., Kovacs,L., Gregersen,N., Nyborg,J., and Pedersen,E.B. (1996). Identification of 13 new mutations in the vasopressin-neurophysin II gene in 17 kindreds with familial autosomal dominant neurohypophyseal diabetes insipidus. *Am.J.Hum.Genet.* *58*, 107-117.

251. Roettger,B.F., Rentsch,R.U., Pinon,D., Holicky,E., Hadac,E., Larkin,J.M., and Miller,L.J. (1995). Dual Patways of Internalization of the Cholecystokinin Receptor. *J.Cell Biol.* *128*, 1029-1041.
252. Romisch,K. (1999). Surfing the Sec61 channel: bidirectional protein translocation across the ER membrane. *J.Cell Sci.* *112 (Pt 23)*, 4185-4191.
253. Rosenthal,W., Antaramian,A., Gilbert,S., and Birnbaumer,M. (1993). Nephrogenic diabetes insipidus. A V2 vasopressin receptor unable to stimulate adenylyl cyclase. *J.Biol.Chem.* *268*, 13030-13033.
254. Roth,J., Zuber,C., Guhl,B., Fan,J.Y., and Ziak,M. (2002). The importance of trimming reactions on asparagine-linked oligosaccharides for protein quality control. *Histochem.Cell Biol.* *117*, 159-169.
255. Rudiger,S., Buchberger,A., and Bukau,B. (1997). Interaction of Hsp70 chaperones with substrates. *Nat.Struct.Biol.* *4*, 342-349.
256. Sachs,H., Fawcett,P., Takabatake,Y., and Portanova,R. (1969). Biosynthesis and release of vasopressin and neurophysin. *Recent Prog.Horm.Res.* *25*, 447-491.
257. Sadeghi,H., Robertson,G.L., Bichet,D.G., Innamorati,G., and Birnbaumer,M. (1997). Biochemical basis of partial nephrogenic diabetes insipidus phenotypes. *Molecular Endocrinology* *11*, 1806-1813.
258. Saito,Y., Ihara,Y., Leach,M.R., Cohen-Doyle,M.F., and Williams,D.B. (1999). Calreticulin functions in vitro as a molecular chaperone for both glycosylated and non-glycosylated proteins. *EMBO J.* *18*, 6718-6729.

259. Salahpour,A., Angers,S., and Bouvier,M. (2000). Functional significance of oligomerization of G-protein-coupled receptors. *Trends Endocrinol Metab* *11*, 163-168.
260. Salahpour,A., Angers,S., Mercier,J.F., Lagace,M., Marullo,S., and Bouvier,M. (2004). Homodimerization of the beta2-adrenergic receptor as a prerequisite for cell surface targeting. *J Biol.Chem.* *279*, 33390-33397.
261. Sambrook,J.F. (1990). The involvement of calcium in transport of secretory proteins from the endoplasmic reticulum. *CELL* *61*, 197-199.
262. Sasaki,S., Fushimi,K., Saito,H., Saito,F., Uchida,S., Ishibashi,K., Kuwahara,M., Ikeuchi,T., Inui,K.-I., Nakajima,K., Watanabe,T.X., and Marumo,F. (1994). Cloning, characterization, and chromosomal mapping of human aquaporin of collecting duct. *J.Clin.Invest.* *93*, 1250-1256.
263. Sato,S., Ward,C.L., Krouse,M.E., Wine,J.J., and Kopito,R.R. (1996). Glycerol reverses the misfolding phenotype of the most common cystic fibrosis mutation. *J.Biol.Chem.* *271*, 635-638.
264. Schlondorff,J. and Blobel,C.P. (1999). Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J Cell Sci.* *112 (Pt 21)*, 3603-3617.
265. Schneider,T., Igelmund,P., and Hescheler,J. (1997). G protein interaction with K⁺ and Ca²⁺ channels. *Trends Pharmacol.Sci.* *18*, 8-11.

266. Schoneberg,T., Sandig,V., Wess,J., Gudermann,T., and Schultz,G. (1997). Reconstitution of mutant V2 vasopressin receptors by adenovirus-mediated gene transfer. Molecular basis and clinical implication. *J.Clin.Invest* 100, 1547-1556.
267. Schoneberg,T., Schultz,G., and Gudermann,T. (1999). Structural basis of G protein-coupled receptor function. *Mol.Cell Endocrinol.* 151, 181-193.
268. Schoneberg,T., Yun,J., Wenkert,D., and Wess,J. (1996). Functional rescue of mutant V2 vasopressin receptors causing nephrogenic diabetes insipidus by a co-expressed receptor polypeptide. *EMBO J.* 15, 1283-1291.
269. Schrag,J.D., Bergeron,J.J., Li,Y., Borisova,S., Hahn,M., Thomas,D.Y., and Cygler,M. (2001). The Structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control of protein folding. *Mol.Cell* 8, 633-644.
270. Schulein,R., Zuhlke,K., Krause,G., and Rosenthal,W. (2001). Functional rescue of the nephrogenic diabetes insipidus-causing vasopressin V2 receptor mutants G185C and R202C by a second site suppressor mutation. *J.Biol.Chem.* 276, 8384-8392.
271. Schulz,A., Grosse,R., Schultz,G., Gudermann,T., and Schoneberg,T. (2000). Structural implication for receptor oligomerization from functional reconstitution studies of mutant V2 vasopressin receptors. *J.Biol.Chem.* 275, 2381-2389.
272. Scott,M.G., Benmerah,A., Muntaner,O., and Marullo,S. (2002). Recruitment of activated G protein-coupled receptors to pre-existing clathrin-coated pits in living cells. *J Biol.Chem.* 277, 3552-3559.

273. Seachrist,J.L. and Ferguson,S.S. (2003). Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis and trafficking by Rab GTPases. *Life Sci.* 74, 225-235.
274. Seifert,R. and Wenzel-Seifert,K. (2002). Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 366, 381-416.
275. Serradeil-Le Gal,C., Wagnon,J., Garcia,C., Lacour,C., Guiraudou,P., Christophe,B., Villanova,G., Nisato,D., Maffrand,J.P., Le Fur,G., and . (1993). Biochemical and pharmacological properties of SR 49059, a new, potent, nonpeptide antagonist of rat and human vasopressin V1a receptors. *J Clin.Invest* 92, 224-231.
276. Seta,K., Nanamori,M., Modrall,J.G., Neubig,R.R., and Sadoshima,J. (2002). AT1 receptor mutant lacking heterotrimeric G protein coupling activates the Src-Ras-ERK pathway without nuclear translocation of ERKs. *J Biol.Chem.* 277, 9268-9277.
277. Shayakul,C., Smith,C.P., Mackenzie,H.S., Lee,W.S., Brown,D., and Hediger,M.A. (2000). Long-term regulation of urea transporter expression by vasopressin in Brattleboro rats. *Am.J Physiol Renal Physiol* 278, F620-F627.
278. Shayakul,C., Steel,A., and Hediger,M.A. (1996). Molecular cloning and characterization of the vasopressin-regulated urea transporter of rat kidney collecting ducts. *J.Clin.Invest* 98, 2580-2587.
279. Sheikh,S.P., Vilardarga,J.P., Baranski,T.J., Lichtarge,O., Iiri,T., Meng,E.C., Nissenson,R.A., and Bourne,H.R. (1999). Similar structures and shared switch mechanisms of the beta2-adrenoceptor and the parathyroid hormone receptor.

- Zn(II) bridges between helices III and VI block activation. *J.Biol.Chem.* 274, 17033-17041.
280. Shenoy,S.K. and Lefkowitz,R.J. (2003a). Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem.J* 375, 503-515.
281. Shenoy,S.K. and Lefkowitz,R.J. (2003b). Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination. *J Biol.Chem.* 278, 14498-14506.
282. Shenoy,S.K., McDonald,P.H., Kohout,T.A., and Lefkowitz,R.J. (2001). Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science* 294, 1307-1313.
283. Shusta,E.V., Raines,R.T., Pluckthun,A., and Wittrup,K.D. (1998). Increasing the secretory capacity of *Saccharomyces cerevisiae* for production of single-chain antibody fragments. *Nat.Biotechnol.* 16, 773-777.
284. SIDEL,V.W. and SOLOMON,A.K. (1957). Entrance of water into human red cells under an osmotic pressure gradient. *J.Gen.Physiol* 41, 243-257.
285. Sifers,R.N. (2003). Cell biology. Protein degradation unlocked. *Science* 299, 1330-1331.
286. Siffroi-Fernandez,S., Giraud,A., Lanet,J., and Franc,J.L. (2002). Association of the thyrotropin receptor with calnexin, calreticulin and BiP. Effects on the maturation of the receptor. *Eur.J.Biochem.* 269, 4930-4937.

287. Simonin,F., Karcher,P., Boeuf,J.J., Matifas,A., and Kieffer,B.L. (2004). Identification of a novel family of G protein-coupled receptor associated sorting proteins. *J Neurochem.* *89*, 766-775.
288. Simons,J.F., Ferro-Novick,S., Rose,M.D., and Helenius,A. (1995). BiP/Kar2p serves as a molecular chaperone during carboxypeptidase Y folding in yeast. *J.Cell Biol.* *130*, 41-49.
289. Slepnev,V.I., Ochoa,G.C., Butler,M.H., Grabs,D., and Camilli,P.D. (1998). Role of phosphorylation in regulation of the assembly of endocytic coat complexes. *Science* *281*, 821-824.
290. Smit,M.J., Leurs,R., Alewijnse,A.E., Blauw,J., Van Nieuw Amerongen,P.G., Van De Vrede,Y., Roovers,E., and Timmerman,H. (1996). Inverse agonism of histamine H2 antagonists accounts for upregulation of spontaneously active histamine H2 receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* *93*, 6802-6807.
291. Smith,B.L. and Agre,P. (1991). Erythrocyte Mr 28,000 transmembrane protein exists as a multisubunit oligomer similar to channel proteins. *J.Biol.Chem.* *266*, 6407-6415.
292. Sousa,M. and Parodi,A.J. (1995). The molecular basis for the recognition of misfolded glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase. *EMBO J.* *14*, 4196-4203.
293. Sousa,M.C., Ferrero-Garcia,M.A., and Parodi,A.J. (1992). Recognition of the oligosaccharide and protein moieties of glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase. *Biochemistry* *31*, 97-105.

294. Stamnes,M.A., Shieh,B.H., Chuman,L., Harris,G.L., and Zuker,C.S. (1991). The cyclophilin homolog *ninaA* is a tissue-specific integral membrane protein required for the proper synthesis of a subset of *Drosophila* rhodopsins. *CELL* 65, 219-227.
295. Sterne-Marr,R. and Benovic,J.L. (1995). Regulation of G protein-coupled receptors by receptor kinases and arrestins. *Vitam.Horm.* 51, 193-234.
296. Stoffel,R.H., III, Pitcher,J.A., and Lefkowitz,R.J. (1997). Targeting G protein-coupled receptor kinases to their receptor substrates. *J Membr.Biol.* 157, 1-8.
297. Stowell,M.H., Marks,B., Wigge,P., and McMahon,H.T. (1999). Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring. *Nat.Cell Biol.* 1, 27-32.
298. Strader,C.D., Fong,T.M., Graziano,M.P., and Tota,M.R. (1995). The family of G-protein-coupled receptors. *FASEB J.* 9, 745-754.
299. Strange,P.G. (1999). G-protein coupled receptors: conformations and states. *Biochem.Pharmacol.* 58, 1081-1088.
300. Strickland,E., Hakala,K., Thomas,P.J., and DeMartino,G.N. (2000). Recognition of misfolding proteins by PA700, the regulatory subcomplex of the 26 S proteasome. *J.Biol.Chem.* 275, 5565-5572.
301. Stronge,V.S., Saito,Y., Ihara,Y., and Williams,D.B. (2001). Relationship between calnexin and BiP in suppressing aggregation and promoting refolding of protein and glycoprotein substrates. *J.Biol.Chem.* 276, 39779-39787.

302. Sui,H., Walian,P.J., Tang,G., Oh,A., and Jap,B.K. (2000). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of water channel AQP1. *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* 56 (Pt 9), 1198-1200.
303. Sullivan,M.L., Youker,R.T., Watkins,S.C., and Brodsky,J.L. (2003). Localization of the BiP molecular chaperone with respect to endoplasmic reticulum foci containing the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in yeast. *J.Histochem.Cytochem.* 51, 545-548.
304. Tahara,A., Tomura,Y., Wada,K.I., Kusayama,T., Tsukada,J., Takanashi,M., Yatsu,T., Uchida,W., and Tanaka,A. (1997). Pharmacological profile of YM087, a novel potent nonpeptide vasopressin V1A and V2 receptor antagonist, in vitro and in vivo. *J Pharmacol.Exp.Ther.* 282, 301-308.
305. Tamarappoo,B.K. and Verkman,A.S. (1998). Defective aquaporin-2 trafficking in nephrogenic diabetes insipidus and correction by chemical chaperones. *J.Clin.Invest.* 101, 2257-2267.
306. Taylor,J.M., Jacob-Mosier,G.G., Lawton,R.G., VanDort,M., and Neubig,R.R. (1996). Receptor and membrane interaction sites on Gbeta. A receptor-derived peptide binds to the carboxyl terminus. *J.Biol.Chem.* 271, 3336-3339.
307. Terrillon,S. and Bouvier,M. (2004). Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep.* 5, 30-34.
308. Terrillon,S., Durroux,T., Mouillac,B., Breit,A., Ayoub,M.A., Taulan,M., Jockers,R., Barberis,C., and Bouvier,M. (2003). Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors

- form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis. *Mol.Endocrinol.* *17*, 677-691.
309. Thibonnier,M., Kilani,A., Rahman,M., DiBlasi,T.P., Warner,K., Smith,M.C., Leenhardt,A.F., and Brouard,R. (1999). Effects of the nonpeptide V(1) vasopressin receptor antagonist SR49059 in hypertensive patients. *HYPERTENSION* *34*, 1293-1300.
 310. Tirosh,B., Furman,M.H., Tortorella,D., and Ploegh,H.L. (2003). Protein unfolding is not a prerequisite for endoplasmic reticulum-to-cytosol dislocation. *J.Biol.Chem.* *278*, 6664-6672.
 311. Tohgo,A., Choy,E.W., Gesty-Palmer,D., Pierce,K.L., Laporte,S., Oakley,R.H., Caron,M.G., Lefkowitz,R.J., and Luttrell,L.M. (2003). The stability of the G protein-coupled receptor-beta-arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation. *J Biol.Chem.* *278*, 6258-6267.
 312. Tohgo,A., Pierce,K.L., Choy,E.W., Lefkowitz,R.J., and Luttrell,L.M. (2002). beta-Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation. *J Biol.Chem.* *277*, 9429-9436.
 313. Trombetta,E.S. and Helenius,A. (2000). Conformational requirements for glycoprotein reglucosylation in the endoplasmic reticulum. *J.Cell Biol.* *148*, 1123-1129.

314. Tsukaguchi,H., Matsubara,H., and Inada,M. (1995a). Expression studies of two vasopressin V2 receptor gene mutations, R202C and 804insG, in nephrogenic diabetes insipidus. *Kidney Int.* *48*, 554-562.
315. Tsukaguchi,H., Matsubara,H., Taketani,S., Mori,Y., Seido,T., and Inada,M. (1995b). Binding-, intracellular transport-, and biosynthesis-defective mutants of vasopressin type 2 receptor in patients with X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *J.Clin.Invest* *96*, 2043-2050.
316. Udelson,J.E., Smith,W.B., Hendrix,G.H., Painchaud,C.A., Ghazzi,M., Thomas,I., Ghali,J.K., Selaru,P., Chanoine,F., Pressler,M.L., and Konstam,M.A. (2001). Acute hemodynamic effects of conivaptan, a dual V(1A) and V(2) vasopressin receptor antagonist, in patients with advanced heart failure. *CIRCULATION* *104*, 2417-2423.
317. Ulloa-Aguirre,A., Stanislaus,D., Janovick,J.A., and Conn,P.M. (1999). Structure-activity relationships of G protein-coupled receptors. *Arch.Med.Res.* *30*, 420-435.
318. Ungar,D. and Hughson,F.M. (2003). SNARE protein structure and function. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* *19*, 493-517.
319. van Os,C.H. and Deen,P.M. (1998). Aquaporin-2 water channel mutations causing nephrogenic diabetes insipidus. *Proc.Assoc.Am.Physicians* *110*, 395-400.
320. Vargas-Poussou,R., Forestier,L., Dautzenberg,M.D., Niaudet,P., Dechaux,M., and Antignac,C. (1997). Mutations in the vasopressin V2 receptor and aquaporin-2 genes in 12 families with congenital nephrogenic diabetes insipidus. *J.Am.Soc.Nephrol.* *8*, 1855-1862.

321. Venter,J.C., Adams,M.D., Myers,E.W., Li,P.W., Mural,R.J., Sutton,G.G., Smith,H.O., Yandell,M., Evans,C.A., Holt,R.A., Gocayne,J.D., Amanatides,P., Ballew,R.M., Huson,D.H., Wortman,J.R., Zhang,Q., Kodira,C.D., Zheng,X.H., Chen,L., Skupski,M., Subramanian,G., Thomas,P.D., Zhang,J., Gabor Miklos,G.L., Nelson,C., Broder,S., Clark,A.G., Nadeau,J., McKusick,V.A., Zinder,N., Levine,A.J., Roberts,R.J., Simon,M., Slayman,C., Hunkapiller,M., Bolanos,R., Delcher,A., Dew,I., Fasulo,D., Flanigan,M., Florea,L., Halpern,A., Hannenhalli,S., Kravitz,S., Levy,S., Mobarry,C., Reinert,K., Remington,K., Abu-Threideh,J., Beasley,E., Biddick,K., Bonazzi,V., Brandon,R., Cargill,M., Chandramouliswaran,I., Charlab,R., Chaturvedi,K., Deng,Z., Di,F., V, Dunn,P., Eilbeck,K., Evangelista,C., Gabrielian,A.E., Gan,W., Ge,W., Gong,F., Gu,Z., Guan,P., Heiman,T.J., Higgins,M.E., Ji,R.R., Ke,Z., Ketchum,K.A., Lai,Z., Lei,Y., Li,Z., Li,J., Liang,Y., Lin,X., Lu,F., Merkulov,G.V., Milshina,N., Moore,H.M., Naik,A.K., Narayan,V.A., Neelam,B., Nusskern,D., Rusch,D.B., Salzberg,S., Shao,W., Shue,B., Sun,J., Wang,Z., Wang,A., Wang,X., Wang,J., Wei,M., Wides,R., Xiao,C., Yan,C., Yao,A., Ye,J., Zhan,M., Zhang,W., Zhang,H., Zhao,Q., Zheng,L., Zhong,F., Zhong,W., Zhu,S., Zhao,S., Gilbert,D., Baumhueter,S., Spier,G., Carter,C., Cravchik,A., Woodage,T., Ali,F., An,H., Awe,A., Baldwin,D., Baden,H., Barnstead,M., Barrow,I., Beeson,K., Busam,D., Carver,A., Center,A., Cheng,M.L., Curry,L., Danaher,S., Davenport,L., Desilets,R., Dietz,S., Dodson,K., Doup,L., Ferriera,S., Garg,N., Gluecksmann,A., Hart,B., Haynes,J., Haynes,C., Heiner,C., Hladun,S., Hostin,D., Houck,J., Howland,T., Ibegwam,C., Johnson,J., Kalush,F., Kline,L., Koduru,S., Love,A., Mann,F., May,D., McCawley,S., McIntosh,T., McMullen,I., Moy,M., Moy,L., Murphy,B., Nelson,K., Pfannkoch,C., Pratt,E., Puri,V., Qureshi,H., Reardon,M.,

- Rodriguez,R., Rogers,Y.H., Romblad,D., Ruhfel,B., Scott,R., Sitter,C., Smallwood,M., Stewart,E., Strong,R., Suh,E., Thomas,R., Tint,N.N., Tse,S., Vech,C., Wang,G., Wetter,J., Williams,S., Williams,M., Windsor,S., Winn-Deen,E., Wolfe,K., Zaveri,J., Zaveri,K., Abril,J.F., Guigo,R., Campbell,M.J., Sjolander,K.V., Karlak,B., Kejariwal,A., Mi,H., Lazareva,B., Hatton,T., Narechania,A., Diemer,K., Muruganujan,A., Guo,N., Sato,S., Bafna,V., Istrail,S., Lippert,R., Schwartz,R., Walenz,B., Yooseph,S., Allen,D., Basu,A., Baxendale,J., Blick,L., Caminha,M., Carnes-Stine,J., Caulk,P., Chiang,Y.H., Coyne,M., Dahlke,C., Mays,A., Dombroski,M., Donnelly,M., Ely,D., Esparham,S., Fosler,C., Gire,H., Glanowski,S., Glasser,K., Glodek,A., Gorokhov,M., Graham,K., Gropman,B., Harris,M., Heil,J., Henderson,S., Hoover,J., Jennings,D., Jordan,C., Jordan,J., Kasha,J., Kagan,L., Kraft,C., Levitsky,A., Lewis,M., Liu,X., Lopez,J., Ma,D., Majoros,W., McDaniel,J., Murphy,S., Newman,M., Nguyen,T., Nguyen,N., and Nodell,M. (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1351.
322. Vines,C.M., Revankar,C.M., Maestas,D.C., LaRusch,L.L., Cimino,D.F., Kohout,T.A., Lefkowitz,R.J., and Prossnitz,E.R. (2003). N-formyl peptide receptors internalize but do not recycle in the absence of arrestins. *J Biol.Chem.* 278, 41581-41584.
323. Voges,D., Zwickl,P., and Baumeister,W. (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu.Rev.Biochem.* 68, 1015-1068.
324. Vogler,O., Nolte,B., Voss,M., Schmidt,M., Jakobs,K.H., and Van Koppen,C.J. (1999). Regulation of muscarinic acetylcholine receptor sequestration and function by beta-arrestin. *J Biol.Chem.* 274, 12333-12338.

325. Wada,I., Imai,S., Kai,M., Sakane,F., and Kanoh,H. (1995). Chaperone function of calreticulin when expressed in the endoplasmic reticulum as the membrane-anchored and soluble forms. *J.Biol.Chem.* 270, 20298-20304.
326. Wall,S.M., Han,J.S., Chou,C.L., and Knepper,M.A. (1992). Kinetics of urea and water permeability activation by vasopressin in rat terminal IMCD. *Am.J.Physiol* 262, F989-F998.
327. Wang,L.H., Sudhof,T.C., and Anderson,R.G. (1995). The appendage domain of alpha-adaptin is a high affinity binding site for dynamin. *J Biol.Chem.* 270, 10079-10083.
328. Ward,D.T., Hammond,T.G., and Harris,H.W. (1999). Modulation of vasopressin-elicited water transport by trafficking of aquaporin2-containing vesicles. *Annu.Rev.Physiol* 61, 683-697.
329. Warnock,D.E., Hinshaw,J.E., and Schmid,S.L. (1996). Dynamin self-assembly stimulates its GTPase activity. *J Biol.Chem.* 271, 22310-22314.
330. Weiss,E.R., Raman,D., Shirakawa,S., Ducceschi,M.H., Bertram,P.T., Wong,F., Kraft,T.W., and Osawa,S. (1998). The cloning of GRK7, a candidate cone opsin kinase, from cone- and rod-dominant mammalian retinas. *Mol.Vis.* 4, 27.
331. Wenkert,D., Schoneberg,T., Merendino,J.J., Jr., Rodriguez Pena,M.S., Vinitzky,R., Goldsmith,P.K., Wess,J., and Spiegel,A.M. (1996). Functional characterization of five V2 vasopressin receptor gene mutations. *Mol.Cell Endocrinol.* 124, 43-50.

332. Wess,J. (1997). G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. [Review] [87 refs]. *FASEB J.* *11*, 346-354.
333. Wetzker,R. and Bohmer,F.D. (2003). Transactivation joins multiple tracks to the ERK/MAPK cascade. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* *4*, 651-657.
334. Whistler,J.L., Enquist,J., Marley,A., Fong,J., Gladher,F., Tsuruda,P., Murray,S.R., and Von Zastrow,M. (2002). Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors. *Science* *297*, 615-620.
335. Wigley,W.C., Fabunmi,R.P., Lee,M.G., Marino,C.R., Muallem,S., DeMartino,G.N., and Thomas,P.J. (1999). Dynamic association of proteasomal machinery with the centrosome. *J.Cell Biol.* *145*, 481-490.
336. Wilkinson,B. and Gilbert,H.F. (2004). Protein disulfide isomerase. *Biochim.Biophys.Acta* *1699*, 35-44.
337. Wojcik,C., Schroeter,D., Wilk,S., Lamprecht,J., and Paweletz,N. (1996). Ubiquitin-mediated proteolysis centers in HeLa cells: indication from studies of an inhibitor of the chymotrypsin-like activity of the proteasome. *Eur.J.Cell Biol.* *71*, 311-318.
338. Wojcik,C., Yano,M., and DeMartino,G.N. (2004). RNA interference of valosin-containing protein (VCP/p97) reveals multiple cellular roles linked to ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis. *J.Cell Sci.* *117*, 281-292.
339. Wojcikiewicz,R.J. (2004). Regulated ubiquitination of proteins in GPCR-initiated signaling pathways. *Trends Pharmacol.Sci.* *25*, 35-41.

340. Xiong,X., Chong,E., and Skach,W.R. (1999). Evidence that endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is linked to retrograde translocation from the ER membrane. *J.Biol.Chem.* 274, 2616-2624.
341. Yang,B., Gillespie,A., Carlson,E.J., Epstein,C.J., and Verkman,A.S. (2001). Neonatal mortality in an aquaporin-2 knock-in mouse model of recessive nephrogenic diabetes insipidus. *J.Biol.Chem.* 276, 2775-2779.
342. Yao,T. and Cohen,R.E. (2002). A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature* 419, 403-407.
343. Yasuda,H., Lindorfer,M.A., Woodfork,K.A., Fletcher,J.E., and Garrison,J.C. (1996). Role of the prenyl group on the G protein gamma subunit in coupling trimeric G proteins to A1 adenosine receptors. *J.Biol.Chem.* 271, 18588-18595.
344. Yokoyama,K., Yamauchi,A., Izumi,M., Itoh,T., Ando,A., Imai, Kamada,T., and Ueda,N. (1996). A low-affinity vasopressin V2-receptor gene in a kindred with X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *Journal of the American Society of Nephrology* 7, 410-414.
345. Yun,J., Schoneberg,T., Liu,J., Schulz,A., Ecelbarger,C.A., Promeneur,D., Nielsen,S., Sheng,H., Grinberg,A., Deng,C., and Wess,J. (2000). Generation and phenotype of mice harboring a nonsense mutation in the V2 vasopressin receptor gene. *J.Clin.Invest* 106, 1361-1371.

346. Zapun,A., Jakob,C.A., Thomas,D.Y., and Bergeron,J.J. (1999). Protein folding in a specialized compartment: the endoplasmic reticulum. *Structure.Fold.Des* 7, R173-R182.
347. Zapun,A., Petrescu,S.M., Rudd,P.M., Dwek,R.A., Thomas,D.Y., and Bergeron,J.J. (1997). Conformation-independent binding of monoglucosylated ribonuclease B to calnexin. *CELL* 88, 29-38.
348. Zhang,J., Barak,L.S., Anborgh,P.H., Laporte,S.A., Caron,M.G., and Ferguson,S.S. (1999). Cellular trafficking of G protein-coupled receptor/beta-arrestin endocytic complexes. *J.Biol.Chem.* 274, 10999-11006.
349. Zhang,J.X., Braakman,I., Matlack,K.E., and Helenius,A. (1997). Quality control in the secretory pathway: the role of calreticulin, calnexin and BiP in the retention of glycoproteins with C-terminal truncations. *Mol.Biol.Cell* 8, 1943-1954.
350. Zhu,X., Zhao,X., Burkholder,W.F., Gragerov,A., Ogata,C.M., Gottesman,M.E., and Hendrickson,W.A. (1996). Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* 272 , 1606-1614.
351. Zwickl,P., Seemuller,E., Kapelari,B., and Baumeister,W. (2001). The proteasome: a supramolecular assembly designed for controlled proteolysis. *Adv.Protein Chem.* 59, 187-222.

Annexe

Bernier, V., Morello, J.P., Zarruk, A., Lonergan, M., Arthus, M.-F., Salahpour, A., Debrand, N., Laperrière, A., Brouard, R., Desjardins, R., Bouvier, M., Bichet, D.G. (2005) Pharmacological chaperones as a potential treatment for X-linked nephrogenic diabetes insipidus, révision au *New England Journal of Medicine*.

Bernier V., Pontier, S.M., Charest, P.G., Bichet, D.G., Bouvier, M. (2005), Probing the ER site of action of the pharmacological chaperone SR121463 reveals a role for DRiP78 upstream of calnexin in the folding of the V2 vasopressin receptor, accepté à *Molecular Biology of the Cell*.

Bernier, V., Bichet, D.G., Bouvier, M. (2004) Pharmacological chaperone action on G-protein-coupled receptors, *Current Opinion in Pharmacology* 4(5), 528-533.

Bernier, V., Lagacé, M., Lonergan, M., Arthus, M-F., Bichet, D.G., Bouvier, M. (2004) Functional Rescue of the Constitutively Internalized V2 Vasopressin Receptor Mutant R137H by the Pharmacological Chaperone Action of SR49059, *Molecular Endocrinology* 18(8), 2074-2084.

Bernier, V., Lagacé, M., Bichet, D.G., Bouvier, M. (2004) Pharmacological chaperones: Potential treatment for conformational diseases, *Trends in endocrinology and metabolism* 15(5), 222-228.

Morello, J.P., **Bernier, V.**, Bouvier, M., Bichet, D.G., (2000) Le sauvetage fonctionnel de mutants AVPR2 responsables du Diabète insipide néphrogénique par des chaperones pharmacologiques, *Médecine/Sciences* 16(10), 1117-1118.

Morello, J.P., Salahpour, A., Laperrière, A., **Bernier, V.**, Arthus, M.-F., Lonergan, M., Petäjä-Repo, U., Angers, S., Morin, D., Bichet, D.G., Bouvier, M. (2000) Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants, *Journal of clinical investigation*, 105(7), 887-895.

